

Titre: Application suivie du retrait de compression statique versus
Title: dynamique in vivo chez le rat : effets sur la croissance osseuse et le
disque intervertébral

Auteur: Anne-Laure Ménard
Author:

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Ménard, A.-L. (2015). Application suivie du retrait de compression statique versus
Citation: dynamique in vivo chez le rat : effets sur la croissance osseuse et le disque
intervertébral [Ph.D. thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/1765/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie:
PolyPublie URL: <https://publications.polymtl.ca/1765/>

**Directeurs de
recherche:** Isabelle Villemure, Florina Moldovan, & Guy Grimard
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

APPLICATION SUIVIE DU RETRAIT DE COMPRESSION STATIQUE VERSUS
DYNAMIQUE IN VIVO CHEZ LE RAT : EFFETS SUR LA CROISSANCE OSSEUSE ET LE
DISQUE INTERVERTÉBRAL

ANNE-LAURE MÉNARD

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JUIN 2015

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

APPLICATION SUIVIE DU RETRAIT DE COMPRESSION STATIQUE VERSUS
DYNAMIQUE IN VIVO CHEZ LE RAT : EFFETS SUR LA CROISSANCE OSSEUSE ET LE
DISQUE INTERVERTÉBRAL

présentée par : MÉNARD Anne-Laure

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. LÉVESQUE Martin, Ph. D., président

Mme VILLEMURE Isabelle, Ph. D., membre et directrice de recherche

Mme MOLDOVAN Florina, Ph. D., membre et codirectrice de recherche

M. GRIMARD Guy, M.D., membre et codirecteur de recherche

Mme PÉRIÉ-CURNIER Delphine, Doctorat, membre

Mme LANGELIER Ève, Ph. D., membre

DÉDICACE

À Maman, Papa, Sam, Tinou et Éva,

« They did not know it was impossible so they did it ». Mark Twain

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je voudrais remercier chaleureusement ma directrice de recherche, D^{re} Isabelle Villemure, véritable mentor scientifique, pour le projet proposé et son encadrement exceptionnel tout au long de mon doctorat. Sa grande confiance, son organisation, son esprit rigoureux et rationnel m'ont beaucoup guidée afin de m'épanouir et d'acquérir les qualités essentielles à un chercheur. Mes co-directeurs, « mes » médecins : D^{re} Florina Moldovan et D^r Guy Grimard, ont également joué un rôle déterminant de mentors dans ma formation, le développement de mes compétences et ma motivation en m'apportant d'incalculables soutiens intellectuel, moral, et médical.

En second lieu, je suis très reconnaissante à D^{re} Marie-Claude Miron qui m'a co-supervisée avec D^r Guy Grimard dans le cadre de mon stage clinique, pour son expertise, sa disponibilité, sa compréhension et son soutien moral dans les moments personnels difficiles.

En troisième lieu, je n'oublierai pas le support et les échanges avec les membres du laboratoire, en commençant par la « maman du labo » Irène Londono, ainsi que le personnel de recherche côtoyé pendant mon doctorat : Charlotte Zaouter, Souad Rhalmi, Saadallah Bouhanik, Julie Couillard, toujours présents pour me raisonner malgré mon caractère têtu. Merci beaucoup à Barthélémy Valteau qui a brillamment réalisé le transfert de connaissances du protocole et techniques expérimentales. L'expertise technique de Thierry Lafrance pour la conception du nouvel appareil et les échanges avec la postdoctorante Aurélie Benoit ont été grandement appréciés. Également, l'excellente qualité et l'efficacité du travail de ma stagiaire d'été, Élise Massol, ont été une aide précieuse pour l'avancement de mon projet. Je souhaite aussi souligner l'excellent travail et contributions respectives de Nour Aimene, Jeanne Daunais, Denise Carrier et l'équipe des techniciens en santé animale du CHU Ste-Justine. Un grand merci à Roxanne Wosu pour la révision de mon résumé en version anglaise. De plus, je tiens à mentionner les amitiés, échanges et soutiens des membres du laboratoire de Mécanobiologie Pédiatrique (LMP) avec Roxanne Wosu, Rosa Kaviani, Mojdeh Tiredash, Cristiane Caouette, Viviane Lalande, Annie Bélisle-L'Anglais, Élise Tremblay, Éloïse Tougas-Leclerc, Candice Soulis, et le LIS3D avec notamment Bahe Hachem, Jérôme Martino, Frédérique Desbiens-Blais, Franck Le Naveaux, Nikita Cobetto, Marina D'Ercole, Sarah Dupuis, Rohan Bianco, Édouard Auvinet, Christian Bellefleur, Nathalie Bourassa, Nathalie Jourdain.

En quatrième lieu, je voudrais remercier chaleureusement D^r Steven K. Boyd pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, le « *Bone Imaging Laboratory* », lors de mon stage MÉDITIS à l'Université de Calgary. Merci aussi aux membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux avec Lauren Burt qui a supervisé mon projet de stage, Clara Sandino, David McErlain, Michelle Kan, Hayley Britz, Jan Owoc, Britta Jorgensen, et William Enns-Bray. Je tiens à mentionner également mes amies d'accueil, Florence Spalding et Melinda Tracey, qui m'ont fait découvrir les beautés de l'Alberta en rendant mon séjour des plus agréables.

En cinquième lieu, je n'aurais jamais pu m'épanouir autant pendant mon doctorat sans l'ambiance amicale des coureurs de Montréal et du club d'athlétisme « les Vainqueurs ». Mes entraîneurs Jean-Yves Cloutier et, à présent, Jean-François Martel m'ont découvert un talent et ont toujours cru en moi malgré les multiples fractures de fatigue qui ont marqué ma seconde année d'athlétisme et de doctorat. Du fond du cœur, merci à mes partenaires d'entraînement d'athlétisme : ensemble dans l'effort vers le même objectif de s'améliorer et donner le meilleur de soi !

En sixième lieu, un immense merci à mon amie athlète élite et partenaire d'entraînement, Marie-Caroline Côté, pour son sourire contagieux et sa joie de vivre, le partage des moments de complicité et de rire, de nos victoires mais aussi de nos souffrances physiques et morales. Un merci tout aussi reconnaissant à mes meilleures amies Laurène Autixier, Roxanne Wosu et Margaux Reyjal, ainsi que mon meilleur ami Alban Normandin malgré la distance, pour leurs présences, leurs précieux conseils, et leurs encouragements infaillibles tout au long de mon doctorat.

En septième lieu, une pensée chaleureuse à mes amis français des Mines de Saint-Étienne, ainsi que Sébastien Tête, Régine Bousquie et Magali Giacino. Parmi ceux rencontrés à Montréal, je tiens à remercier : Émilie Baudo, Haya Sellam, Emmanuelle Sommier, Negar Nabatian, Lucie Chapelle, Mathilde Excoffier, et Louise Richard.

En huitième lieu, merci à tous les membres de ma famille pour leurs supports incroyables : ma cousine « grande sœur » France-Pascale, ma marraine Marie-Anne, mes cousins, mes oncles et tantes dont Michèle Eccart, mes « grands-parents adoptifs » Colette et Gatien Nardin et leur fille Aurore, ainsi que des amis de longue date de la famille : Isabelle et Régis Becquart, et Marie-France et Jean-Marie Bertaux. Je ne peux passer sous silence ceux qui sont partis pour toujours

pendant mon doctorat : Maminou, grand-tante Jeannette, Jacques Lefur, et grand-tante Jackie ; puissiez-vous reposer en paix pour l'éternité. Merci infiniment à vous, mes grands-parents biologiques que j'ai si bien connus, Mamie Cécile et Papi Pierre, ainsi que Mamie d'Angers ; vous n'avez jamais quitté mes pensées ni mon cœur, et vous vivez en moi chaque jour de ma vie.

Pour finir, mes parents Joëlle et Jean-François Ménard ont témoigné d'une confiance sans pareil pour que je puisse m'épanouir professionnellement et construire ma future carrière. Du fond du cœur, merci pour vos amours inconditionnels, les valeurs enseignées, tout ce que vous m'avez toujours donné sans compter, et pour avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Pour la « super fratrie », mes petits frère et sœur, Samuel et Béatrice Ménard, vous m'avez fourni la force de traverser les épreuves, et de me battre avec toute l'intensité physique et morale possible ; je vous admire et serai toujours présente pour vous. La Tinou avec ton immense cœur, ta maturité exceptionnelle, tes talents artistiques et littéraires, tu as un futur sublime et des possibilités infinies devant toi. Et toi Sam, esprit scientifique et créatif hors pair, tu dompteras tes démons pour aller toi aussi au bout de tes rêves, heureux, libre et accompli, j'en suis certaine.

RÉSUMÉ

L'environnement mécanique est essentiel pour permettre la croissance normale des os longs et vertèbres. À l'inverse, les chargements mécaniques peuvent aussi entraîner la progression de déformations musculosquelettiques pédiatriques, comme la scoliose idiopathique adolescente, une déformation tridimensionnelle du rachis. Plus spécifiquement, le principe de modulation mécanique de la croissance indique que l'augmentation de compression ralentit la croissance alors que la réduction de compression l'accélère. De nouvelles approches sans fusion pour le traitement des jeunes patients avec des scolioses précoces sévères ou idiopathiques adolescentes modérées sont basées sur ce principe et exploitent le potentiel de croissance restant des patients pour corriger les déformations. Ces approches sont dites sans fusion entre les niveaux vertébraux adjacents car elles évitent d'enlever les disques, comme dans les chirurgies standard avec instrumentation, permettant ainsi de maintenir la mobilité rachidienne. Or, comme les patients peuvent avoir un potentiel de croissance résiduel après correction de leurs déformations et retrait des implants, il convient de s'assurer que ce potentiel de croissance demeure actif après la fin du traitement. Des études *in vivo* ont montré que les chargements dynamiques préservent davantage la plaque de croissance. Cependant, aucune étude *in vivo* n'a caractérisé la modulation de croissance suite à différents profils de chargements dynamiques. Par ailleurs, la reprise possible de croissance suite au retrait de compression contrôlée n'a jamais été investiguée. De plus, les chargements mécaniques sont également un des facteurs contribuant à la dégénérescence discale. Il devient donc d'intérêt d'investiguer la réponse mécanobiologique du disque intervertébral sous une compression visant la modulation de croissance souhaitée par les traitements sans fusion du rachis. L'objectif général de ce projet consiste à appliquer *in vivo*, avec le modèle du rat, une modulation de croissance osseuse contrôlée et à vérifier si l'intégrité tissulaire et fonctionnelle de la plaque de croissance et du disque intervertébral est préservée suite à l'application de différents profils de compressions statiques et dynamiques et ce, immédiatement suite au chargement et également suite à une période subséquente de retrait du chargement.

Tout d'abord, une première étude expérimentale a été réalisée sur des rats répartis en cinq groupes : contrôle, sham (0 MPa), dynamique à haute fréquence (0.2 MPa \pm 30% à 1.0 Hz), dynamique à haute amplitude (0.2 MPa \pm 100% à 0.1 Hz), et dynamique avec hautes fréquence et

amplitude ($0.2 \text{ MPa} \pm 100\%$ à 1.0 Hz). Un appareil de micro-chargement a été implanté pour transmettre les compressions à la 7^{ème} vertèbre caudale, pendant 15 jours. Les taux de croissance, la hauteur totale de la plaque de croissance et de ses zones, la hauteur des chondrocytes hypertrophiques et la densité linéaire de la zone proliférative ont ensuite été mesurés et comparés entre les groupes. Les résultats montrent que la modulation mécanique de croissance est contrôlée par la contrainte moyenne. En effet, le taux de croissance a diminué similairement de 22.4% et 23.0%, respectivement pour les dynamiques avec augmentation de fréquence ou bien d'amplitude comparé aux shams. Les hauteurs totales et des zones des plaques de croissance ainsi que la hauteur moyenne des chondrocytes hypertrophiques et la densité linéaire de chondrocytes prolifératifs sont demeurés similaires entre shams et dynamiques avec augmentation de fréquence ou bien d'amplitude. Par contre, l'augmentation combinée de fréquence et d'amplitude a entraîné des infections sur les animaux, suggérant que la contrainte résultante réellement ressentie par les tissus était plus élevée que celle ciblée (0.2 MPa) et plus grande que la capacité d'adaptation des tissus.

Par la suite, une seconde étude expérimentale a été effectuée sur des rats répartis en deux groupes (2 semaines et 4 semaines) comprenant chacun quatre sous-groupes : contrôle, sham (0 MPa), statique (0.2 MPa) et dynamique ($0.2 \text{ MPa} \pm 30\%$ à 0.1 Hz). Les rats de 2 semaines ont eu 15 jours de compression, alors que ceux du groupe de 4 semaines ont reçu 15 jours de compression suivis de 10 jours de retrait de compression avant euthanasie. La compression était transmise à la 7^{ème} vertèbre caudale et aux deux disques intervertébraux adjacents par un appareil de micro-chargement modifié et adapté aux besoins expérimentaux. D'une part, les taux de croissance, l'histomorphométrie de la plaque de croissance et la minéralisation au niveau de la zone de calcification provisionnelle ont été mesurés et comparés entre les groupes et sous-groupes. D'autre part, la structure (hauteur, proportion noyau/anneau) et le contenu en protéoglycanes du noyau du disque intervertébral ont été quantifiés et comparés entre les groupes et sous-groupes. Pour vérifier l'absence de douleur neuropathique causée par l'implantation de l'appareil ainsi que l'ajout de compression, des mesures quantitatives par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse des concentrations en substance P et en peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) ont été réalisées à partir de la corne dorsale des moelles épinières. Les résultats de croissance et d'histomorphométrie de la plaque de croissance des deux groupes (2 et 4 semaines) ont montré que la modulation de croissance était similaire suite à l'application suivie

du retrait de compressions statique ou dynamique avec une même contrainte moyenne. À 2 semaines, les taux de croissance étaient réduits de 20.1% et de 19.7% pour les groupes statique et dynamique, comparé aux shams, avec une réduction de la hauteur totale de la plaque de croissance de 11.7% et 10.8%, respectivement pour les statique et dynamique par rapport aux shams. À 4 semaines, aucune différence significative n'a été observée sur les taux de croissance ni les hauteurs de plaque de croissance entre shams et groupes chargés. La minéralisation était augmentée après retrait de compression dynamique à 4 semaines, de 2.1% comparé aux contrôles et 2.4% comparé aux groupes shams et statiques. En effet, un chargement de type dynamique favoriserait les échanges de fluide, donc le transport d'ions, de nutriments et autres protéines, ce qui permettrait d'augmenter le métabolisme cellulaire, le renouvellement de la matrice et le processus de minéralisation. En termes de structure du disque intervertébral, les deux compressions statique et dynamique ont réduit les ratios de hauteur du disque (disque chargé divisé par le disque contrôle) similairement de 18.4% et 18.7% respectivement par rapport aux shams et ce, même après retrait de compression avec 23.6% et 25.6% de réduction. Cependant, le type de compression a pu être discriminé au niveau du contenu en protéoglycanes du noyau qui, d'abord augmenté directement suite aux compressions statique et dynamique de 20.4% et 23.5% respectivement par rapport aux shams, a diminué après retrait de compression statique (aucune différence comparé aux shams) par rapport au scénario dynamique (28.8% d'augmentation comparé aux shams). L'application de compression statique pourrait causer un clivage de protéoglycanes, mais tant que la compression est maintenue les portions de protéoglycanes resteraient dans le noyau. Par contre, après retrait de compression, les petits fragments de protéoglycanes pourraient migrer hors du noyau, ce qui expliquerait la diminution observée. Or, la perte de protéoglycanes du noyau est un signe précurseur de dégénérescence discale. De ces observations, il est suggéré que la compression dynamique préserverait davantage l'intégrité du disque intervertébral à plus long terme. Aucune différence n'a été observée dans les concentrations en substance P et en CGRP entre les groupes et sous-groupes. Les valeurs numériques étaient semblables à celles des rats sains de la littérature et il a donc été conclu que l'implantation de l'appareil et l'application de compression n'entraînait pas de douleur neuropathique à long terme.

Les limites de ce projet incluent le nombre restreint d'animaux utilisés par groupe pour la première étude expérimentale, essentiellement dû à des problèmes d'approvisionnement

rencontrés avec le système de chargement, qui a par la suite été revu et modifié pour la seconde étude. L'utilisation du modèle animal du rat comporte aussi des limites intrinsèques pour le transfert de ces connaissances vers l'homme, dont sa quadrupédie modifiant le mode de chargement ainsi que sa petite taille. De plus, les disques intervertébraux des rats comportent des cellules notochordales avec un métabolisme plus élevé et donc un potentiel de régénération plus rapide que l'homme, ce qui rend ce modèle conservateur. Enfin, les mécanismes biologiques et moléculaires ainsi que la composition de la matrice extracellulaire de la plaque de croissance, qui jouent un rôle important dans la régulation de la croissance et la compréhension des phénomènes d'interaction entre chargement appliqué macroscopiquement et réponse cellulaire, n'ont pas été traités dans ce projet.

En dépit des limitations, cette étude est la première à investiguer *in vivo* l'effet de différentes combinaisons de paramètres de compression dynamique cyclique (fréquence, amplitude) sur la modulation de croissance. Par ailleurs, elle apporte des connaissances sur la mécanobiologie de la plaque de croissance et du disque intervertébral suite à l'application et au retrait subséquent de deux types de compression (statique, dynamique), pendant la poussée de croissance du rat analogue à l'adolescence chez l'homme. L'ensemble de ces connaissances présente un grand intérêt clinique pour le développement de nouveaux implants sans fusion et les impacts des traitements actuels appliquant de la compression sur les tissus mous de jeunes patients.

Pour conclure, à modulation de croissance identique, la compression dynamique préserverait davantage l'intégrité et la fonctionnalité des tissus mous (plaque de croissance, disque intervertébral) que la compression statique. Ces connaissances sont essentielles afin de mieux comprendre, prévoir les effets à plus long terme et concevoir des traitements offrant le meilleur compromis aux jeunes patients en période de croissance et avec des déformations musculosquelettiques progressives.

Mots-clés : plaque de croissance, compression statique/dynamique *in vivo*, mécanobiologie, reprise de croissance, disque intervertébral, modèle du rat, minéralisation, histomorphométrie.

ABSTRACT

Mechanical loading is essential for normal bone growth of long bones and vertebrae. Conversely, mechanical loading can also lead to the progression of pediatric musculoskeletal deformities, such as adolescent idiopathic scoliosis, a three-dimensional spinal deformity. More specifically, the principle of the mechanical modulation of bone growth states that increasing compression reduces bone growth, while reducing compression accelerates it. Novel fusionless approaches for the treatment of pediatric patients with severe early onset scoliosis or moderate adolescent idiopathic scoliosis are based on this principle and exploit the remaining growth potential of patients to correct deformities. These approaches are fusionless since they avoid adjacent vertebral fusion and disc retrieval, as in standard surgery procedures using heavy instrumentation, and therefore maintain spinal mobility. However, since patients can still have remaining growth potential after correction of their deformities and implant removal, it is important to ensure that this growth potential remains active post-treatment. *In vivo* studies have shown that dynamic loading would better preserve growth plate tissue. However, no *in vivo* study has investigated growth modulation following several dynamic loading conditions or possible growth resumption after removing controlled loading. In addition, mechanical loading contributes to disc degeneration. It is therefore of interest to investigate the mechanobiological response of the intervertebral disc under compression used for fusionless treatments applications to modulate growth. The overall objective of this project is to apply *in vivo* controlled bone growth modulation using the rat tail model in order to verify if the integrity of growth plate and intervertebral disc tissues and their functionalities is preserved following different profiles of static and dynamic compression, immediately following loading, and after a period of unloading.

First, an experimental study was conducted on rats divided into five groups: control, sham (0 MPa), dynamic at high frequency ($0.2 \text{ MPa} \pm 30\%$ at 1.0 Hz), dynamic with high magnitude ($0.2 \text{ MPa} \pm 100\%$ at 0.1 Hz), and dynamic with both high frequency and magnitude ($0.2 \text{ MPa} \pm 100\%$ at 1.0 Hz). A micro-loading device was implanted to apply compression to the 7th caudal vertebra for 15 days. Growth rates, growth plate total height and zone height, hypertrophic chondrocyte height and linear density in the proliferative zone were measured and compared between groups. Results show that mechanical modulation of bone growth is controlled by the average stress value. Growth rate was similarly reduced by 22.4% and 23.0%, respectively for the dynamic

group with increased frequency or magnitude compared with shams. Growth plate total height and zone height, as well as hypertrophic chondrocyte mean height and linear density of proliferative chondrocytes remained similar between the sham and dynamic group with either increased frequency or magnitude. However, the combination of increased frequency and magnitude lead to infection, suggesting that the resulting stress on tissues exceeded the theoretical mean stress value (0.2 MPa) as well as the tissue adjustment capacity.

A second experimental study was conducted on rats distributed in two groups (2 weeks and 4 weeks), each of them containing four subgroups: control, sham (0 MPa), static (0.2 MPa) and dynamic (0.2 MPa \pm 30% at 0.1 Hz). In the 2 week group, rats sustained 15 days of compression, while rats in the 4 week group received 15 days of compression followed by 10 days of unloading prior to euthanasia. Compression was applied to the 7th caudal vertebra and the two surrounding intervertebral discs with a micro-loading device modified and adapted to experimental requirements. First, growth rates, growth plate histomorphometry and mineralization at the provisional calcification zone were measured and compared between groups and subgroups. Second, structure (height, nucleus/annulus proportion) and proteoglycan content of the intervertebral disc nucleus were quantified and compared between groups and subgroups. To verify the lack of neuropathic pain induced by device implantation and added compression, quantitative measurements of substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) were performed on the dorsal horn of rat spinal cords using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Results of growth rates and growth plate histomorphometry of the two groups (2 and 4 weeks) showed that growth modulation was similar following application and subsequent removal of both stress-equivalent static and dynamic compression. At 2 weeks, growth rates were reduced by 20.1% and 19.7% in the static and dynamic groups, compared to shams, along with a reduction of total growth plate height of 11.7% and 10.8%, respectively for the static and dynamic groups compared to shams. At 4 weeks, no significant difference was observed in the growth rates and growth plate heights between shams and loaded groups. Mineralization was increased following dynamic compression removal at 4 weeks, by 2.1% compared to controls and 2.4% compared to both sham and static groups. Indeed, dynamic loading would stimulate fluid exchange, and therefore transportation of ions, nutrients and other proteins, which would increase cell metabolism, matrix turnover and the mineralization process. Concerning intervertebral disc structure, both static and dynamic compressions reduced disc

height ratios (loaded disc divided by control disc) similarly by 18.4% and 18.7% respectively compared to shams, and this reduction remained by 23.6% and 25.6% respectively following unloading. However, compression type was discriminated according to nucleus proteoglycan content, which at first directly increased by 20.4% and 23.5% when applying static and dynamic compression compared with shams, but decreased after static compression removal (no difference compared with shams) in relation to the dynamic scenario (28.8% increase compared to shams). Static compression could result in proteoglycan cleavage, but as long as compression is maintained, proteoglycan fragments would remain within the nucleus. Nonetheless, after compression removal, smaller proteoglycan fragments could migrate outside of the nucleus, which would explain the observed reduction. Yet, nucleus proteoglycan loss is an early sign of disc degeneration. These observations suggest that dynamic compression would better preserve long-term intervertebral disc integrity. No difference was obtained in substance P and CGRP concentrations between groups and subgroups. Numerical values were similar to healthy rats in the literature. It was concluded that device implantation and compression application did not cause long-term neuropathic pain.

Limitations of this research project include a restricted number of animals per group in the first experimental study, caused by supply problems encountered with the loading system, which had been revised and modified prior to use in the second study. Moreover, the rat model comprises inherent limitations for knowledge transfer to humans, namely loading modifications caused by quadrupedal movement as well as its small size. Rat intervertebral discs contain notochordal cells, which have higher metabolism, and therefore a faster regeneration potential than humans, which makes it more preservative. Finally, biological and molecular mechanisms, along with growth plate extracellular matrix composition, which play a key role in growth regulation and the understanding of interaction phenomena between macroscopically applied loading and cellular response, were not addressed in this thesis.

Despite the aforementioned limitations, this study is the first to investigate different combinations of cyclic dynamic compression parameters (frequency, magnitude) on growth modulation *in vivo*. Moreover, the study provides knowledge on growth plate and intervertebral disc mechanobiology following application and subsequent removal of static and dynamic compression during the rat growth spurt, similar to human puberty. This knowledge presents clinical interest for the

development of new fusionless implants and the understanding of the impacts of current treatments applying compression on soft tissues in pediatric patients.

In conclusion, with similar growth modulation, dynamic compression would better preserve the integrity and functionality of soft tissues such as the growth plate, and intervertebral disc, compared to static compression. This knowledge is essential in order to better understand, as well as predict long-term effects and design treatments offering the best compromise to pediatric growing patients with progressive musculoskeletal deformities.

Keywords: growth plate, *in vivo* static/dynamic compression, mechanobiology, growth resumption, intervertebral disc, rat model, mineralization, histomorphometry.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT	XI
TABLE DES MATIÈRES	XV
LISTE DES TABLEAUX.....	XXII
LISTE DES FIGURES	XXIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXVIII
LISTE DES ANNEXES	XXX
INTRODUCTION.....	1
Organisation de la thèse	2
CHAPITRE 1 : REVUE DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Croissance endochondrale et plaque de croissance.....	4
1.1.1 Étapes de la croissance	4
1.1.2 Structure et composition de la plaque de croissance (PC)	5
1.1.3 Minéralisation et formation du nouvel os	12
1.1.4 Régulation de la croissance	17
1.1.5 Fin de croissance et sénescence de la PC	18
1.2 Disque Intervertébral.....	18
1.2.1 Structure et composition.....	18
1.2.2 Fonction mécanique	21
1.2.3 Dégénérescence	21
1.2.4 Remodelage et adaptation du disque à l'environnement mécanique	24

1.3	Environnement mécanique et croissance	25
1.3.1	Remodelage osseux	25
1.3.2	Modulation de croissance : principe de Hueter-Volkmann.....	25
1.3.3	Cercle vicieux et progression des déformations avec la croissance.....	26
1.3.4	Déformations musculosquelettiques progressives	27
1.3.5	Nouveaux traitements sans fusion pour la scoliose.....	31
1.3.6	Rattrapage de croissance	34
1.4	Mécanobiologie de la plaque de croissance et du disque intervertébral : études <i>in vivo</i>	35
1.4.1	Effets des chargements mécaniques en compression sur la plaque de croissance	35
1.4.2	Effets des chargements mécaniques en compression sur le disque intervertébral	39
1.4.3	Limitations liées à l'utilisation du modèle du rat.....	47
CHAPITRE 2 : RATIONNELLE DE PROJET, QUESTIONS DE RECHERCHE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....		49
2.1	Rationnelle du projet	49
2.2	Questions de recherche.....	51
2.3	Objectifs spécifiques	51
CHAPITRE 3 : ARTICLE 1 : IN VIVO DYNAMIC LOADING REDUCES BONE GROWTH WITHOUT HISTOMORPHOMETRIC CHANGES OF THE GROWTH PLATE..		56
3.1	Abstract	57
3.2	Keywords	57
3.3	Introduction	57
3.4	Methods.....	59
3.4.1	Animal Model and Loading Conditions.....	59
3.4.2	Micro-loading Device System and Calibration	61
3.4.3	Surgery and Experimental Procedure.....	62

3.4.4	Daily Adjustments and Calcein Injections	63
3.4.5	Tissue Collection and Processing.....	63
3.4.6	Growth Rate and Histomorphometric Parameters	63
3.4.7	Statistical Analyses	64
3.5	Results	64
3.5.1	Effect of the Surgical Procedure	64
3.5.2	Growth Rate (GR)	67
3.5.3	Histomorphometric Parameter: Total Growth Plate Height.....	68
3.5.4	Histomorphometric Parameter: Growth Plate Zone Heights	69
3.5.5	Histomorphometric Parameter: Number of Proliferative Chondrocytes per Column (CNC)	70
3.5.6	Histomorphometric Parameter: Hypertrophic Cell Height (CH)	70
3.5.7	Cd5 and Cd9 Intra-Animal Vertebrae Control.....	70
3.6	Discussion	70
3.6.1	Modulation of Bone Growth Rate Is Controlled by the Average Compressive Stress	71
3.6.2	Increasing Both Frequency and Magnitude Might Create a More Severe Mechanical Condition for the Growth Plate Extracellular Matrix and/or Cells	71
3.6.3	Dynamic Growth Modulation Cannot Solely be Explained by Histomorphometric Changes	72
3.7	Conclusion.....	73
3.8	Acknowledgements	73
3.9	References	73
CHAPITRE 4 : ARTICLE 2 : BONE GROWTH RESUMPTION FOLLOWING IN VIVO STATIC AND DYNAMIC COMPRESSION REMOVAL ON RATS		78

4.1	Abstract	79
4.2	Keywords	79
4.3	Introduction	80
4.4	Methods.....	82
4.4.1	<i>In Vivo</i> Experimental Conditions	82
4.4.2	Compression Device	84
4.4.3	Surgical Procedure and Animal Care	85
4.4.4	Spinal Cord Collection and Analysis	85
4.4.5	Vertebrae Collection	85
4.4.6	Growth Rate and Histomorphometric Parameters	86
4.4.7	Mineralization	87
4.4.8	Statistical Comparison.....	87
4.5	Results	88
4.5.1	Substance P and CGRP Concentrations were not Modulated by Static nor Dynamic Loadings	88
4.5.2	Cd7 Growth Rate (GR) is Modulated After 2 Weeks of Loading (2 Weeks Group) but Resumes Following Both Static and Dynamic Unloading (4 Weeks Group)	88
4.5.3	Cd7 Total Growth Plate Height (GPH) is Modulated Similarly to Cd7 Growth Rates	91
4.5.4	Cd7 Growth Plate Zone Heights are Similar in All Groups.....	91
4.5.5	Cd7 Hypertrophic Cell Height (CH) is Reduced in 2 Weeks Static and Dynamic Subgroups but is Restored at 4 Weeks	91
4.5.6	Cd7 Mineralization is Similar at 2 Weeks but is Increased Significantly in 4 Weeks Dynamic Subgroup.....	92

4.5.7 Cd5 Within-Animal Control Vertebra is Showing Similar Growth Rates and Histomorphometric Parameters in Both 2 and 4 Weeks Groups, but Different Calcification Intensities at 2 Weeks.....	93
4.6 Discussion	94
4.6.1 Bone Growth is Modulated by Both Static and Dynamic Compression Application and Removal.....	94
4.6.2 Growth Plate Histomorphometry is Preserved After Both Static and Dynamic Loading Removal	95
4.6.3 Mineralization is Increased in Dynamic Loading Even After Compression Removal, Compared to Controls, and Does not Correlate With Endochondral Bone Growth	96
4.6.4 Limitations	96
4.6.5 Conclusion.....	97
4.7 Acknowledgements	97
4.8 Authors' roles.....	98
4.9 References	98
CHAPITRE 5 : ARTICLE 3 : STATIC AND DYNAMIC COMPRESSION APPLICATION AND REMOVAL ON THE INTERVERTEBRAL DISCS OF GROWING RATS	104
5.1 Abstract	105
5.2 Keywords	105
5.3 Introduction	105
5.4 Methods.....	107
5.4.1 <i>In Vivo</i> Experimental Setup.....	107
5.4.2 Compressive Loading Application.....	109
5.4.3 Tissue Processing	110
5.4.4 Intervertebral Disc Height.....	110

5.4.5	Intervertebral Disc Histology	111
5.4.6	Stereological Analyses – Nucleus Versus Annulus Proportions.....	112
5.4.7	Proteoglycan Content of the Nucleus.....	112
5.4.8	Statistical Analyses	112
5.5	Results	112
5.5.1	Static and Dynamic Rats Showed Similar Nucleus Proteoglycan Increase at 2 Weeks, But at 4 Weeks it Decreased Among Static and Remained High Among Dynamic Rats....	113
5.5.2	Static and Dynamic Rats Resulted in Similar Intervertebral Disc Height Reduction in Both 2 and 4 Weeks Groups.....	114
5.5.3	Static and Dynamic Rats Showed Similar Nucleus Versus Annulus Proportions ...	115
5.5.4	Static and Dynamic Discs had Similar Qualitative Aspects of Their Annulus Fibers	116
5.5.5	A Sham Effect was Observed in Nucleus Proteoglycan Content and in Intervertebral Disc Height at 2 Weeks	116
5.5.6	Little Differences were Obtained Between Intra-Animal Intervertebral Disc Controls D ₄₅	117
5.6	Discussion	117
5.6.1	Differences Between Static and Dynamic Compression Became Apparent Following Loading Removal	118
5.6.2	Static and Dynamic Intervertebral Disc Height Remained Reduced Even After Loading Removal	119
5.6.3	Sham Effect and Limitations are Associated to the Used Rat Model	120
5.6.4	Conclusion.....	120
5.7	Acknowledgements	121
5.8	References	121
CHAPITRE 6	: DISCUSSION GÉNÉRALE	126

6.1	Conditions de compressions dynamiques	126
6.1.1	Choix des conditions de chargement dynamique	126
6.1.2	Seuils d'adaptation	127
6.1.3	Niveau et durée ou historique de compression.....	128
6.2	Reprise de croissance et minéralisation	129
6.2.1	Effet sham	129
6.2.2	Reprise de croissance : effet de la durée de la période de retrait de chargement.....	130
6.2.3	Minéralisation.....	130
6.3	Géométrie et intégrité du disque intervertébral	131
6.3.1	Réduction de hauteur discale et effet sham	131
6.3.2	Réduction de hauteur discale et compression à temps plein	132
6.3.3	Protéoglycanes dans le noyau du disque	132
6.4	Limitations générales des études.....	132
6.4.1	Protocole expérimental <i>in vivo</i>	133
6.4.2	Choix du modèle de la queue de rat	133
6.4.3	Conditions pathologiques.....	134
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		135
BIBLIOGRAPHIE		139
ANNEXES		155

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Synthèse des études <i>in vivo</i> appliquant de la compression (statique et/ou dynamique) sur le disque intervertébral.	40
Tableau 2.1: Présentation globale des analyses et paramètres évalués dans les trois prochains chapitres	54
Table 3.1: Number of rats per group and loading parameters.....	60
Table 3.2: Parameters of the loaded vertebra Cd7 (mean value \pm SD) with [*] p < 0.01 compared to shams and ^{ct} p < 0.01 compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CNC: number of proliferative chondrocytes per column in the proliferative zone (PZ), CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ). (^a) Inflammations occurred in all rats loaded with Dyn (c); surgeries had to be interrupted and no results could be obtained for this group.....	65
Table 3.3: Parameters of the within-animal control vertebra Cd5 (mean value \pm SD) with [*] p < 0.01 compared to shams and ^{ct} p < 0.01 compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CNC: number of proliferative chondrocytes per column in the proliferative zone (PZ), CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).....	66
Table 3.4: Parameters of the within-animal control vertebra Cd9 (mean value \pm SD) with [*] p < 0.01 compared to shams and ^{ct} p < 0.01 compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CNC: number of proliferative chondrocytes per column in the proliferative zone (PZ), CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).....	67
Table 4.1: Experimental groups/subgroups: number of rats, age and weight at surgery and euthanasia (mean value \pm SD) with ^a p < 0.05 compared to controls.	83
Table 4.2: Pain peptides concentration (mean value \pm SD) at 4 weeks in lumbar spinal cord. SP: substance P, and CGRP: calcitonin gene-related peptide.	88
Table 4.3: Growth rate and histomorphometric results for the loaded vertebra Cd7 (mean value \pm SD) with ^a p < 0.05 and ^{aa} p < 0.01 compared to shams, and with ^b p < 0.05 and ^{bb} p < 0.01 compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).	89

Table 4.4: Growth rate and histomorphometric results for the within-animal control vertebra Cd5 (mean value \pm SD) with ^a p < 0.05 and ^{aa} p < 0.01 compared to shams, and with ^b p < 0.05 and ^{bb} p < 0.01 compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).	93
Table 5.1: Experimental design: number of rats per groups, subgroups, and loading protocol...	109
Table 5.2: Composition of the inter-animal control disc D ₄₅ and the loaded disc D ₇₈ (mean value \pm SD) with [†] p < 0.01 compared to controls, ^{**} p < 0.01 compared to shams and ^{##} p < 0.01 compared to statics. Number of rats per subgroup is n = 6 for all discs of all subgroups except the dynamic one at 2w and 4w groups, where exceptions are indicated as follows: (X ₄₅) refers to n = 5 for D ₄₅ , and (X ₇₈) to n = 5 for D ₇₈	114
Table 5.3: Heights of the inter-animal control disc D ₄₅ and the loaded disc D ₇₈ (mean value \pm SD) with [†] p < 0.05 and [‡] p < 0.01 compared to controls, and [*] p < 0.05 and ^{**} p < 0.01 compared to shams.	117
Tableau 0.1: Mesures et validation pour chaque paramètre expérimental évalué dans les différents chapitres.	159

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Structure de l'os long en croissance (adapté de (Marieb and Lachaine 2005)).....	4
Figure 1.2: Zones histologiques de la plaque de croissance d'un rat, sur une lame colorée à la toluidine bleue (microscope optique grossissement X20).....	5
Figure 1.3: Contribution respective des zones de la PC au taux de croissance (adapté de (Wilsman, et al. 1996b)).....	8
Figure 1.4: Structure en triple hélice du collagène (adapté de http://gharbimen.blogspot.ca/2012/10/quest-ce-que-le-collagene.html).....	9
Figure 1.5: Structure d'une PG (adapté de (Nordin 2001)).....	11
Figure 1.6: Minéralisation montrant la plaque de croissance (PC) et la zone de calcification provisionnelle (ZPC) (Tsai, et al. 2013), sur une lame de vertèbre de rat colorée à l'alizarine rouge (microscope optique grossissement X10)	12
Figure 1.7: Unité de remodelage osseux montrant le couplage temporel entre ostéoclastes et ostéoblastes (adapté de https://www.math.duke.edu/mathbio/projects/ryser.html)	16
Figure 1.8: Régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes de la PC (adapté de (Mackie, et al. 2008))	17
Figure 1.9: Rachis dans les plans frontal (vue antérieure) et sagittal (adapté de http://www.dreamstime.com/stock-image-human-spine-image5498771) et exemple de disque intervertébral (adapté de (White and Panjabi)).....	19
Figure 1.10: Synthèse et dégradation de l'aggrécane (adapté de (Sivan, et al. 2014))	20
Figure 1.11: Comportement d'un disque sain en compression (adapté de (White and Panjabi)) ..	21
Figure 1.12: Dégénérescence discale (adapté de (Chan, et al. 2011))	22
Figure 1.13: Cercle vicieux expliquant la progression des déformations (adapté de (Aronsson, et al. 1999))	26
Figure 1.14: Plan frontal vue postérieure d'un patient normal (gauche) <i>versus</i> scoliotique (droite) avec une scoliose thoracique droite (adapté de http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=A00615)	27

Figure 1.15: <i>Genu varum/valgum</i> (adapté de http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?12/10/12453)	29
Figure 1.16: Patient avec la maladie de Blount, avant et après traitement par ostéotomie tibiale et épiphysiodèse (adapté de (Greene 1993))	30
Figure 1.17: Spondylolyse (à gauche, adapté de http://www.artrose-blog.nl/rugaandoeningen/spondylolyse/) et spondylolsthésis (à droite, adapté de http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=A00588)	31
Figure 1.18: Traitements sans fusion pour les patients avec EOS et SIA en fonction de l'angle de Cobb (adapté de (Hunt, et al. 2010) et (Skaggs, et al. 2013))	33
Figure 1.19: Incertitude de reprise de croissance après retrait de chargement et des implants sans fusion	38
Figure 1.20: Effets de la compression à long terme sur la composition du disque intervertébral <i>in vivo</i> sur des chiens (adapté de (Hutton, et al. 2000))	46
Figure 2.1: Représentation graphique du projet	53
Figure 3.1: Loading conditions. The grey line represents the mean stress value of 0.2MPa.	60
Figure 3.2: Micro-loading device. A: Air-compressed system installed on the rat tail. B: Calibration of the device on the micro-loading apparatus (MACH-1). C: Rat tail positioned on the surgical guide to ensure a perfect alignment of the tail at the center of Cd6 and Cd8 fixations.	62
Figure 3.3: Growth rate measurements. The arrow indicates the reference group used in comparisons. The presented data are listed in the growth rate (GR) column of Tables 2, 3 and 4.	68
Figure 3.4: Optic microscope images of growth plates. A: Control group, B: Sham group, C: Dyn (a) (30%, 1.0Hz), D: Dyn (b) (100%, 0.1Hz). Toluidine blue, 10X.	68
Figure 3.5: Histomorphometric results for the within-animal control vertebrae (Cd5 and Cd9) and the loaded vertebra (Cd7). The presented data are listed in the growth plate height (GPH), the number of proliferative cells per column (CNC) and the chondrocyte height (CH) columns of Tables 2, 3 and 4. Fig.5-A: Total growth plate height, Fig.5-B: Proportions of	

growth plate zone heights, Fig.5-C: Number of proliferative chondrocytes per column, Fig.5-D: Hypertrophic cell height.	69
Figure 4.1: Experimental setup and design. A: Protocol timeline. B: Installation and rat housing. C: Fluoroscopic image of device implantation. D: Device daily adjustment.....	84
Figure 4.2: Measurements on microtome slices. A: Selection of three planes cutting through vertebra center and measurements on both proximal and distal growth plates (GP). B: Alizarin red pixels intensity quantification using a custom-designed clustering method (Matlab).....	86
Figure 4.3: Growth results for Cd7. A: Growth rates. B: Total growth plate height. C: Growth plate zonal height percentages with RZ: reserve zone, PZ: proliferative zone and HZ: hypertrophic zone. D: Hypertrophic cell heights. In A through D: the arrow indicates the reference group used in comparisons.	90
Figure 4.4: Mineralization results for Cd7. A: Optic microscope images of growth plates stained with alizarin red (10X) with scale bar representing 100µm. B: Alizarin red pixels intensity assessment.	92
Figure 5.1: Experimental protocol. A: Experimental design and loading device installed on a rat tail. B: Experimental groups. C: Static and dynamic compression protocols.	108
Figure 5.2: Measurement methods. A: Disc height measurements on microCT images showing interpolation and measurements generated by Matlab. B: Point-counting method for measuring nucleus <i>versus</i> annulus proportions. C: Measurement of nucleus proteoglycan content on Safranin-O stained images using ImageJ.....	111
Figure 5.3: Nucleus proteoglycan content. A: Comparison of disc D ₇₈ morphology from Safranin-O images (X2.5 magnification) for all groups. B: Nucleus proteoglycan content for loaded discs D ₇₈ . Arrowheads represent reference groups used for comparisons, with ** p < 0.01.....	113
Figure 5.4: Disc height. A: Comparison of disc D ₇₈ morphology from reconstructed microCT images for all groups (note: discs do not show on microCT images). B: Comparison of intervertebral disc D ₇₈ height normalized with D ₄₅ height. Arrowheads represent reference groups used for comparisons, with * p < 0.05 and ** p < 0.01.	115

Figure 0.1: Sections de tissus montrant les vertèbres et disques analysés	155
Figure 0.2: Mesures de taux de croissance sur une lame observée en microscopie à fluorescence (grossissement X5).....	156
Figure 0.3: Mesures des hauteurs de disque avec le programme Matlab.....	157
Figure 0.4: Méthode stéréologique de comptage de points appliquée à une lame de disque intervertébral, colorée à la toluidine bleue et imagée en microscopie optique (X2.5).....	158

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des sigles et abréviations présente, dans l'ordre alphabétique, les sigles et abréviations utilisés dans cette thèse ainsi que leur signification en anglais lorsque pertinent et en français :

ADAMTS	<i>Adamalysin-thrombospondins</i> / Aggrécanases
AF	<i>Annulus Fibrosus</i> / Anneau fibreux
AIS / SIA	<i>Adolescent Idiopathic Scoliosis</i> / Scoliose idiopathique de l'adolescent
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> / Phosphatase alcaline
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> / Analyse de variance
BrdU	Bromodéoxyuridine
CdN	N ^{ème} vertèbre caudale
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i> / Peptide relié au gène de la calcitonine
CS	<i>Chondroitin sulfate</i> / Sulfate de chondroïtine
D _{x(x+1)}	Disque intervertébral compris entre les vertèbres caudales x et (x+1)
EOS	<i>Early Onset Scoliosis</i> / Scolioses précoces
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> / Facteurs de croissance des fibroblastes
GAG	Glycosaminoglycane
GH	<i>Growth hormone</i> / Hormone de croissance
GP / PC	<i>Growth plate</i> / Plaque de croissance
HA / AH	<i>Hyaluronic acid</i> / Acide hyaluronique
Ihh	Indian hedgehog
KS	<i>Keratan sulfate</i> / Sulfate de kératan
MEC	Matrice extracellulaire
MMA	<i>Methyl metacrylate</i> / Méthacrylate de méthyle
MMP	Métalloprotéinase

MPa	Mégapascal
NP	<i>Nucleus pulposus</i> / Noyau pulpeux
OPN	Ostéopontine
PG	Protéoglycane
PTH	<i>Parathyroid hormone</i> / Hormone parathyroïdienne
PTHrP	<i>Parathyroid hormone related protein</i> / Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> / Activateur de récepteur du ligand kappa B de facteur nucléaire
SP	Substance P
ROI	<i>Region of interest</i> / Région d'intérêt
TGF	<i>Transforming growth factor</i> / Facteur de croissance transformant
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> / Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEPTR	<i>Vertical Expandable Prosthetic Titanium Rib</i> ® / Prothèse costale verticale expansible en titane ®
ZH	Zone hypertrophique
ZP	Zone proliférative
ZPC	<i>Zone of Provisional Calcification</i> / Zone de calcification provisionnelle
ZR	Zone de réserve

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : COMPLÉMENTS MÉTHODOLOGIQUES.....	155
---	-----

INTRODUCTION

La croissance longitudinale des os longs et vertèbres est régulée par de nombreux facteurs intrinsèques tels que la génétique, les hormones systémiques (hormone de croissance, estrogènes, hormone thyroïdienne), ou encore les facteurs de croissance produits localement (Ballock and O'Keefe 2003b; Kronenberg 2003; Li, et al. 2011; Mackie, et al. 2008), et des facteurs extrinsèques comme l'environnement mécanique (Stokes 2002; Villemure and Stokes 2009a). Les variations individuelles sont le fruit de l'ensemble de ces facteurs (Mackie, et al. 2011). Les chargements mécaniques s'avèrent essentiels pour assurer une croissance normale des os, tissus vivants en perpétuel renouvellement s'adaptant aux stimuli auxquels ils sont soumis (Reich, et al. 2008; Turner 1998; Villemure and Stokes 2009a).

La croissance longitudinale a lieu au niveau des plaques de croissance (PC), tissus cartilagineux situés entre l'épiphyse et la métaphyse des os longs et vertèbres (Alvarez, et al. 2000; Ballock and O'Keefe 2003b; Hunziker 1994). Depuis le début du XIX^e siècle, il est reconnu que l'environnement mécanique module la croissance osseuse et modifie la structure et la composition de la plaque de croissance (Aronsson, et al. 1999; Turner 1998; Villemure and Stokes 2009a). En effet, d'après la loi de Hueter-Volkmann, une augmentation de compression sur les plaques de croissance ralentit la croissance et, inversement, une diminution de compression l'accélère (Aronsson, et al. 1999; Mente, et al. 1999). Ce principe permet d'expliquer la progression des déformations musculosquelettiques des jeunes enfants et adolescents (Mente, et al. 1999). En effet, une asymétrie initiale de chargement entraîne une asymétrie de croissance locale selon Hueter-Volkmann, ce qui engendre une déformation locale des tissus, contribuant ainsi à créer une déformation globale. Les déformations s'accroissent par la suite au fil de la croissance selon un cercle vicieux (Aronsson, et al. 1999). Cependant, la modulation de croissance alliée au potentiel de croissance du patient peut également être exploitée afin de corriger ces mêmes déformations. Il s'agit du principe de base de la conception de nouveaux traitements orthopédiques pour corriger les déformations musculo-squelettiques pédiatriques. Plus particulièrement, la scoliose est une déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale, qui progresse et s'aggrave pendant les périodes de poussée de croissance (Akbarnia, et al. 2012; Samdani, et al. 2014; Skaggs, et al. 2013). Pour les jeunes patients avec des scolioses précoces ou avec une scoliose idiopathique adolescente, de nouveaux implants

(Betz, et al. 2005; Betz, et al. 2010; Hunt, et al. 2010; Newton, et al. 2008; Samdani, et al. 2014; Schmid, et al. 2008; Skaggs, et al. 2013) permettent d'appliquer des chargements en compression pour ralentir la croissance du côté convexe de la courbure rachidienne scoliotique (Newton, et al. 2008; Skaggs, et al. 2013). Ces implants présentent de nombreux avantages, dont la réduction de risques chirurgicaux lors de l'opération minimalement invasive, et la préservation de la mobilité rachidienne en évitant la fusion des disques intervertébraux (Akbarnia, et al. 2012). Cependant, ces implants sans fusion, tels que les configurations en agrafes ou vis et ligaments (Hunt, et al. 2010), sans ancrés dans deux vertèbres adjacentes entourant le disque intervertébral en son centre, induisant ainsi une compression sur l'ensemble de l'unité fonctionnelle de vertèbres et disques intervertébraux. Les effets à long terme de ces implants sur la fonctionnalité des plaques de croissance et sur l'intégrité des disques intervertébraux d'individus en croissance restent à déterminer.

Le disque intervertébral sain permet le maintien et le mouvement des segments vertébraux les uns par rapport aux autres (Roughley, et al. 2014; Walsh and Lotz 2004). Cependant avec l'âge, ou suite à des conditions pathologiques ou encore à des chargements supra-physiologiques, une dégénérescence discale peut se développer (Hutton, et al. 1998; Lotz, et al. 1998; Sivan, et al. 2014). Les premiers signes de dégénérescence touchent le noyau, et se manifestent par une perte de hauteur du disque ainsi que des changements dans la structure et la composition du disque (Hutton, et al. 2000; Stokes and Iatridis 2004).

L'objectif général de ce projet consiste à appliquer *in vivo*, chez le modèle du rat, une modulation de croissance osseuse contrôlée et de vérifier si l'intégrité tissulaire et fonctionnelle de la plaque de croissance et du disque intervertébral est préservée, suite à l'application de différents profils de chargements statiques et dynamiques.

Organisation de la thèse

Cette thèse comporte six chapitres. Le premier chapitre présente la revue de littérature nécessaire à la compréhension des connaissances actuelles sur le projet. Dans le second chapitre, la rationnelle du projet, les questions de recherche ainsi que les objectifs spécifiques permettant de vérifier les hypothèses scientifiques sont énoncés. Les chapitres 3 à 5 présentent le cœur du travail sous forme de trois articles scientifiques et répondent aux objectifs établis précédemment. En effet, le chapitre 3 est constitué du premier article scientifique intitulé '*In Vivo Dynamic*

Loading Reduces Bone Growth Without Histomorphometric Changes of the Growth Plate’ publié dans la revue *Journal of Orthopaedic Research*. Cette étude investigate les effets de différentes combinaisons de paramètres dynamiques avec la même contrainte moyenne sur la croissance osseuse et l’histomorphométrie de la plaque de croissance. Le quatrième chapitre comprend le second article *‘Bone Growth Resumption Following In vivo Static and Dynamic Compression Removal on Rats’* soumis dans la revue *Journal of Bone and Mineral Research*. Dans cet article, la croissance, l’histomorphométrie de la plaque de croissance, la minéralisation et la douleur neuropathique sont évalués et comparés en fonction du type de compression (statique *versus* dynamique) et après retrait de ces compressions. Le cinquième chapitre contient le troisième article *‘Static and Dynamic Compression Application and Removal on the Intervertebral Discs of Growing Rats’* soumis dans la revue *Journal of Orthopaedic Research*. Cet article compare la géométrie du disque intervertébral et le contenu en protéoglycanes du noyau du disque avec les mêmes conditions de chargement que l’article précédent. Le sixième chapitre dresse une discussion générale afin de mettre en perspective l’apport scientifique original de l’ensemble des travaux de cette thèse. Pour finir, une dernière partie résume l’ensemble des travaux réalisés et énonce également des recommandations pour la poursuite des recherches sur cette même voie.

CHAPITRE 1 : REVUE DES CONNAISSANCES

1.1 Croissance endochondrale et plaque de croissance

1.1.1 Étapes de la croissance

La croissance endochondrale ou longitudinale, par opposition à la croissance par apposition au niveau du périchondre, s'effectue au droit des plaques de croissances (PC). La plaque de croissance (PC), aussi appelée cartilage de conjugaison ou encore plaque épiphysaire, est un tissu cartilagineux de type hyalin, situé entre la métaphyse et l'épiphyse des os longs (Figure 1.1) et des vertèbres (Alvarez, et al. 2000; Hunziker 1994). Chaque os long possède donc deux plaques de croissance, alors qu'il n'y en a qu'une seule sur les plus petits os comme ceux des mains et des pieds par exemple (métacarpes et phalanges) (Anderson and Shapiro 2010).

Chez l'homme, la plaque de croissance est présente à l'enfance et l'adolescence, et disparaît à la maturité osseuse en fin de puberté marquant le début de l'âge adulte. La fermeture de la plaque de croissance s'effectue sous l'action d'hormones, telles que les œstrogènes (Mackie, et al. 2011).

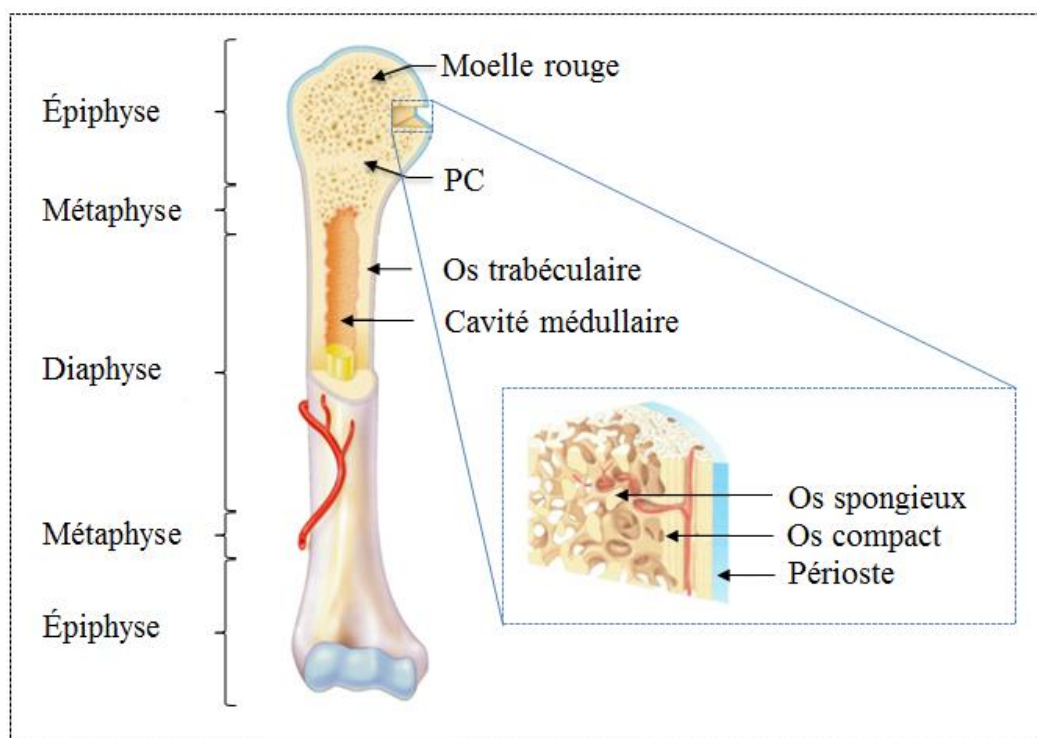


Figure 1.1: Structure de l'os long en croissance (adapté de (Marieb and Lachaine 2005))

1.1.2 Structure et composition de la plaque de croissance (PC)

La PC est une structure hautement polarisée et orientée (Zerath, et al. 1997) composée de cellules, appelées chondrocytes, baignant dans une matrice extracellulaire hydratée (Ballock and O'Keefe 2003b).

1.1.2.1 Chondrocytes de la PC

L'activité des chondrocytes de la PC est le déterminant principal de la croissance longitudinale (Hunziker and Schenk 1989a). Fonctionnellement, la PC comprend trois zones avasculaires : zone de réserve (ZR), zone proliférative (ZP) et zone hypertrophique (ZH) (Figure 1.2). Au-delà de la zone hypertrophique se trouve la zone de calcification où la minéralisation a lieu.

Les chondrocytes deviennent progressivement matures au fil des zones et divisions cellulaires. Ils sont arrangés en colonnes verticales représentant des unités fonctionnelles de la croissance longitudinale (Hunziker and Schenk 1989a). Ainsi, le cycle de vie des chondrocytes est résumé au sein d'une colonne (Hunziker 1994). À niveau horizontal équivalent, le niveau de maturation est identique et a lieu de façon synchronisé (Alvarez, et al. 2000; Hunziker and Schenk 1989a).

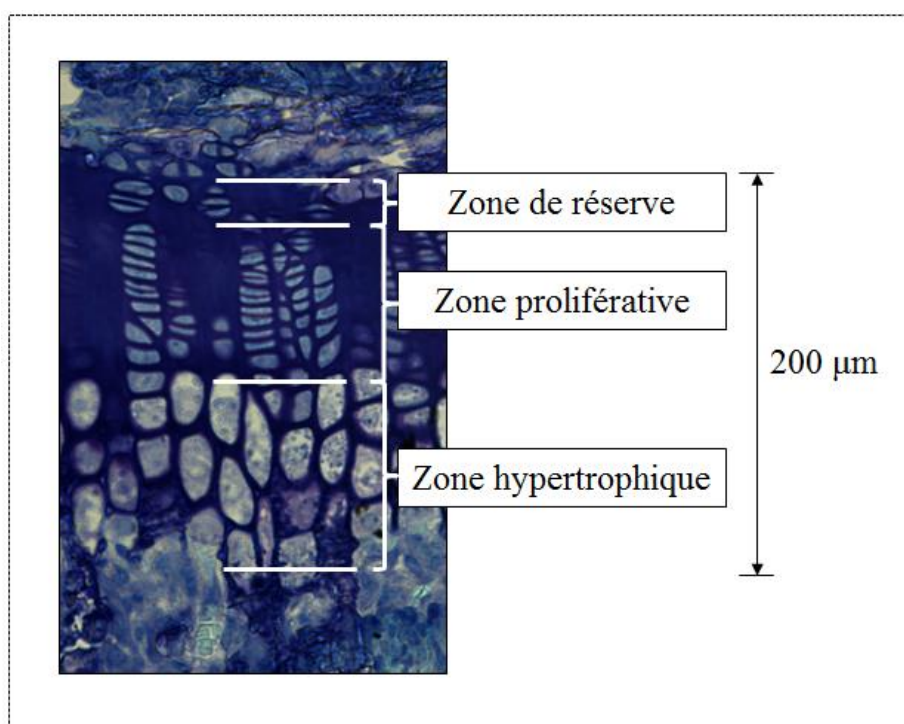


Figure 1.2: Zones histologiques de la plaque de croissance d'un rat, sur une lame colorée à la toluidine bleue (microscope optique grossissement X20)

a. Zone de réserve (ZR)

La zone la plus distale de la diaphyse est appelée zone de réserve. Elle comporte des chondrocytes de petites tailles dans un état quiescent, au sein d'une matrice riche en protéines et en collagène de type IIb (Wongdee, et al. 2012). Le ratio de matrice extracellulaire sur le volume de cellules est d'environ 70%, ce qui est relativement élevé et maximal parmi les zones de la PC (Buckwalter, et al. 1986). Les chondrocytes de cette zone approvisionnent la zone proliférative.

b. Zone proliférative (ZP)

Cette zone est parfois subdivisée en deux sous-zones : zone proliférative supérieure près de la zone de réserve et inférieure près de la zone hypertrophique. Le ratio matrice sur cellules est d'environ 55-60% (Buckwalter, et al. 1986). Au niveau de la jonction entre les zones de réserve et proliférative, les chondrocytes se divisent perpendiculairement à l'axe de croissance (Hunziker 1994). Ils secrètent du collagène de types II et XI (Wongdee, et al. 2012). La forme des chondrocytes est plus aplatie (Amini, et al. 2010a) et ces derniers se réorganisent ensuite en colonnes pour se placer les uns sous les autres plutôt que côte à côte. Cet arrangement colonnaire contribue à la croissance longitudinale. Après un certain nombre de division, les cellules perdent leur capacité à se multiplier et entrent en hypertrophie (Alvarez, et al. 2000). Au niveau structurel, les chondrocytes prolifératifs montrent la proportion maximale de noyau, de réticulum endoplasmique, de mitochondrie et de membrane de Golgi, et en contrepartie, ils ont une proportion minimale d'espace cytoplasmique (Buckwalter, et al. 1986).

c. Zone hypertrophique (ZH)

La zone hypertrophique peut être également subdivisée en deux sous-parties : une zone de maturation et une zone de dégénérescence (Hunziker 1994; Hunziker, et al. 1987). Le ratio matrice sur cellules est minimal parmi les zones de la PC, égal à environ 30% (Buckwalter, et al. 1986). Dans cette zone, les divisions cellulaires cessent ; les chondrocytes se différencient et leur forme s'arrondit (Amini, et al. 2010b). Ils présentent le plus grand espace cytoplasmique parmi les chondrocytes des trois zones (Buckwalter, et al. 1986). La durée de la phase hypertrophique reste constante (autour de 48h chez les rats) indépendamment de l'âge ou du taux de croissance (Hunziker and Schenk 1989a). Au cours de cette phase, chez le rat de 35 jours, le volume des chondrocytes augmente d'un facteur 10 (Hunziker, et al. 1987), celui de la matrice d'un facteur 2.7 et la hauteur des chondrocytes, contribuant directement à la croissance longitudinale, d'un

facteur 5 (Hunziker 1994). Par conséquent, une expansion s'effectue au niveau de l'axe longitudinal de croissance principalement car leurs largeurs demeurent relativement constantes (Amini, et al. 2010a). Le mécanisme sous-jacent du gonflement cellulaire est dû majoritairement à une accumulation d'une grande quantité d'eau par rapport à l'expansion des organelles (Buckwalter, et al. 1986). Farnum et coll. ont proposé une hypothèse pour expliquer l'hypertrophie et énoncent que celle-ci serait causée par une intégration d'une grande quantité d'osmolytes organiques. Cependant, cette hypothèse ne donnerait qu'une augmentation de 6-7% du volume total des chondrocytes donc il ne s'agit pas de l'unique paramètre qui entre en jeu (Farnum, et al. 2002). Par ailleurs, les chondrocytes hypertrophiques jouent un rôle majeur dans l'initiation de la minéralisation. Ils ont une fonction métabolique importante car ils expriment du collagène de type X (Cancel, et al. 2008; Reich, et al. 2008) ainsi que des niveaux élevés de phosphatase alcaline (Ballock and O'Keefe 2003b).

d. Contribution des zones à la croissance en longueur

Les chondrocytes constituent les acteurs principaux de l'élongation des os à travers la prolifération, l'hypertrophie, la sécrétion et la dégradation de la matrice. La contribution de ces différents paramètres varie en fonction de la période de croissance (du taux de croissance donc de l'âge), des localisations anatomiques, ainsi que de l'espèce considérée (Farnum, et al. 2002; Mackie, et al. 2011; Wilsman, et al. 1996a; Wilsman, et al. 1996b). Cependant, l'hypertrophie s'avère l'étape la plus efficace pour la croissance longitudinale des os comme l'a confirmée l'étude de Wilsman et coll. en considérant quatre PC différentes de rats (tibia et radius, proximal et distal) et en posant les hypothèses de l'équilibre de l'activité de la PC sur 24h (durée de calcul des paramètres) et de la modélisation de la PC comme un cylindre (Wilsman, et al. 1996b). La contribution de l'hypertrophie à la croissance est d'autant plus marquée que le taux de croissance est élevé. En contrepartie, la contribution de la part de la synthèse de la matrice est moindre lorsque le taux de croissance est important (Figure 1.3) (Wilsman, et al. 1996b). C'est pourquoi une relation directe de proportionnalité a été proposée entre l'augmentation de croissance et l'augmentation de la hauteur des chondrocytes (Stokes, et al. 2007; Stokes, et al. 2005a; Villemure and Stokes 2009a).

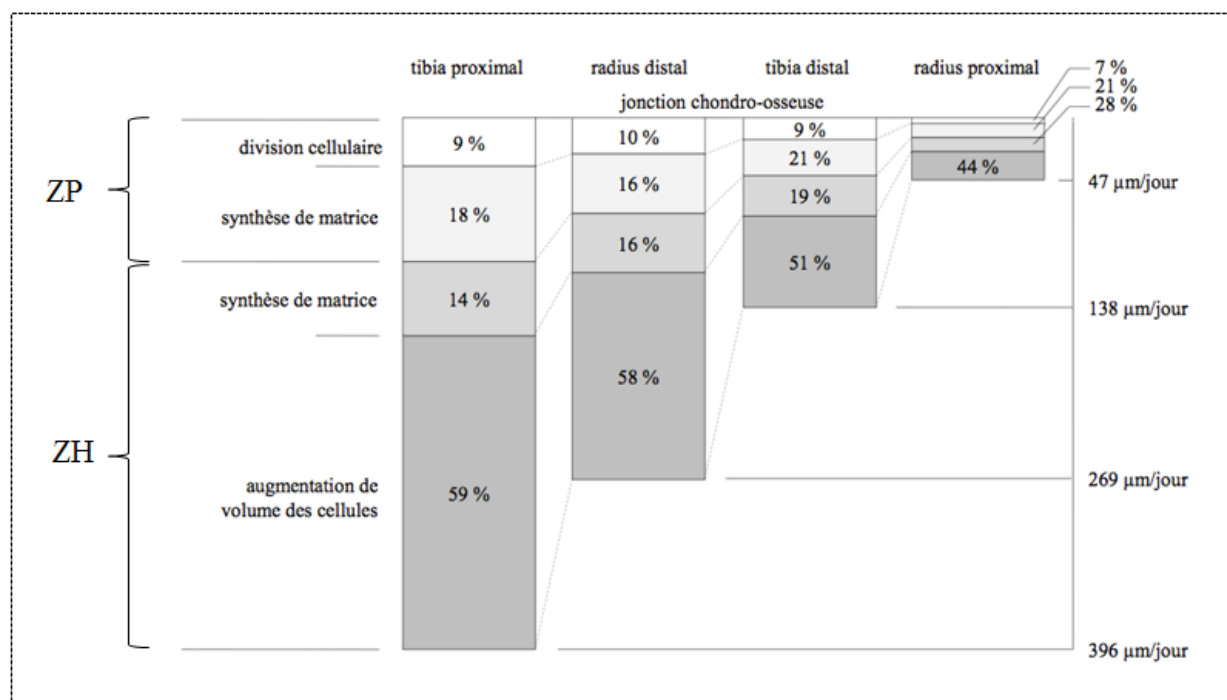


Figure 1.3: Contribution respective des zones de la PC au taux de croissance (adapté de (Wilsman, et al. 1996b))

Par ailleurs, en comparant des groupes de rats d'âge différent, Hunziker et coll. ont montré qu'une augmentation de +20% du taux de croissance était corrélée à une augmentation de +55% de prolifération cellulaire et de +50% de production matricielle (Hunziker and Schenk 1989a). Dans une phase de décélération de croissance (âge des rats de 35 à 80 jours), ils ont trouvé -75% de réduction du taux de croissance associée à une réduction de hauteur de PC (-69%), ainsi que des augmentations de la prolifération cellulaire (+18%) et de production de matrice de (+16%) (Hunziker and Schenk 1989a).

1.1.2.2 Organisation et composition de la matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est sécrétée, renouvelée et dégradée par les chondrocytes à l'intérieur de celle-ci (Ballock and O'Keefe 2003b; Mackie, et al. 2011).

a. Organisation de la MEC

La MEC est organisée en trois compartiments distincts (Hunziker 1994; Hunziker, et al. 1987). Le compartiment péri-cellulaire entoure chaque chondrocyte, il est riche en aggrécane et autres molécules matricielles. Le compartiment adjacent de matrice territoriale contient un réseau de

fibrilles de collagène de types II, IX et XI. Ce compartiment délimite les colonnes de chondrocytes de la PC entre elles. Enfin, la matrice interterritoriale est localisée entre les colonnes de chondrocytes, à savoir dans les septa longitudinales (Hunziker 1994).

b. Composition de la MEC

La MEC est constituée d'eau (65-80%), de collagène (15-25%), de glycosaminoglycanes (GAG), de protéoglycanes (PG), et d'autres protéines non collagéniques (environ 10%) (Salter 1998). Elle contient également des enzymes.

c. Collagène

Le collagène est une protéine fibreuse formée par un assemblage hélicoïdal de trois chaînes α . Une fois secrétées dans la MEC, les molécules individuelles en triple hélice de collagène se regroupent en fibrilles (Figure 1.4) puis en fibres (jusqu'à 10 μm de diamètre). La MEC comprend du collagène de types II (principalement), IX, X et XI. Le collagène de type II est réparti dans l'ensemble de la plaque de croissance, en particulier dans la zone proliférative (Reich, et al. 2005), et il est moins abondant dans la zone hypertrophique (Mackie, et al. 2011). Le collagène de type X est sécrété par les chondrocytes hypertrophiques et caractérise la zone hypertrophique (O'Keefe, et al. 1997; Reich, et al. 2005; Wang, et al. 2004).

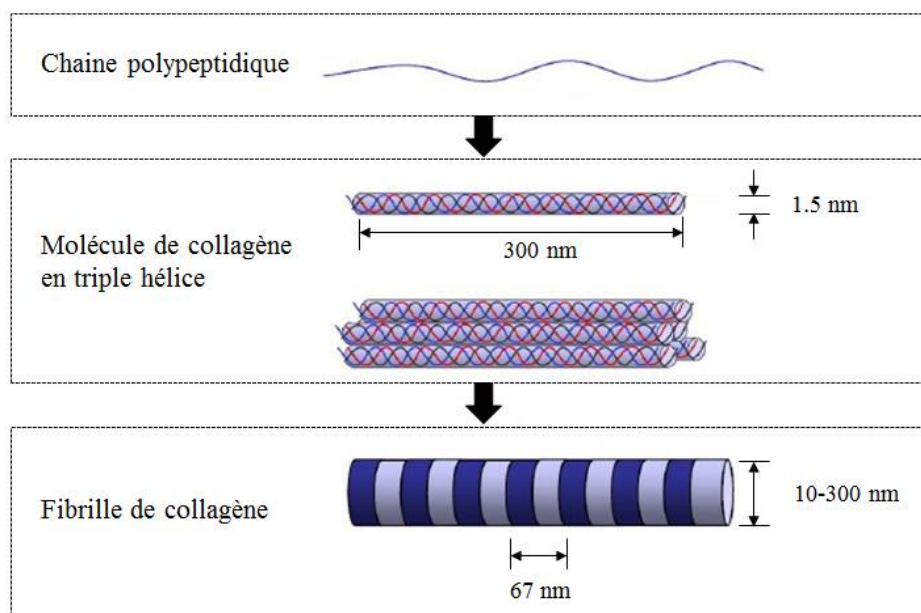


Figure 1.4: Structure en triple hélice du collagène (adapté de

<http://gharbimen.blogspot.ca/2012/10/quest-ce-que-le-collagene.html>)

d. Glycosaminoglycanes (GAG)

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides non ramifiés constituées de la répétition d'un même motif disaccharide. Parmi les principaux GAG de la MEC, on peut citer l'acide hyaluronique (AH), le sulfate de chondroïtine (CS), et le sulfate de kératane (KS). En particulier, l'acide hyaluronique est peu présent dans la zone de réserve et proliférative de la PC (Noonan, et al. 1996). Par contre, on observe une augmentation en gradient de la distribution spatiale de l'AH dans la zone hypertrophique avec la concentration la plus élevée localisée au niveau des lacunes près du front de minéralisation (Pavasant, et al. 1994). Les chondrocytes hypertrophiques secrètent de l'AH dans l'espace péri-cellulaire. Or, l'AH est une macromolécule capable d'absorber de grandes quantités d'eau ce qui la rend capable d'exercer des hautes pressions hydrostatiques sur le tissu environnant. Cette propriété favorise l'expansion de la lacune donc permet l'hypertrophie et la croissance (Pavasant, et al. 1996a). L'AH serait ensuite dégradée par les cellules ostéoprogénitrices qui expriment le récepteur CD44. Le récepteur se lie spécifiquement à l'AH pour qu'il soit internalisé et dégradé par les lysosomes des cellules (Pavasant, et al. 1994; Pavasant, et al. 1996a). Par ailleurs, la régulation d'AH est effectuée par les facteurs de croissance. Le processus de maturation des chondrocytes qui comprend les étapes de production d'AH, d'expansion de la lacune et de dégradation de l'AH pourrait expliquer les variations observées des taux de croissance entre les PC de sites anatomiques distincts et chez des individus différents (Pavasant, et al. 1996b).

e. Protéoglycanes (PG)

Les protéoglycanes ou peptidoglycanes (PG) de la MEC sont des polysaccharides constitués de chaînes de GAG assemblées sur un noyau protéique (Figure 1.5). En particulier, l'aggrécane est l'assemblage de PG le plus abondant de la PC et comprend des chaînes de plus d'une centaine de kératane sulfate et de sulfate de chondroïtine. Le contenu en protéoglycanes est maximal dans les régions de minéralisation près de la jonction ostéochondrale (Mwale, et al. 2002).

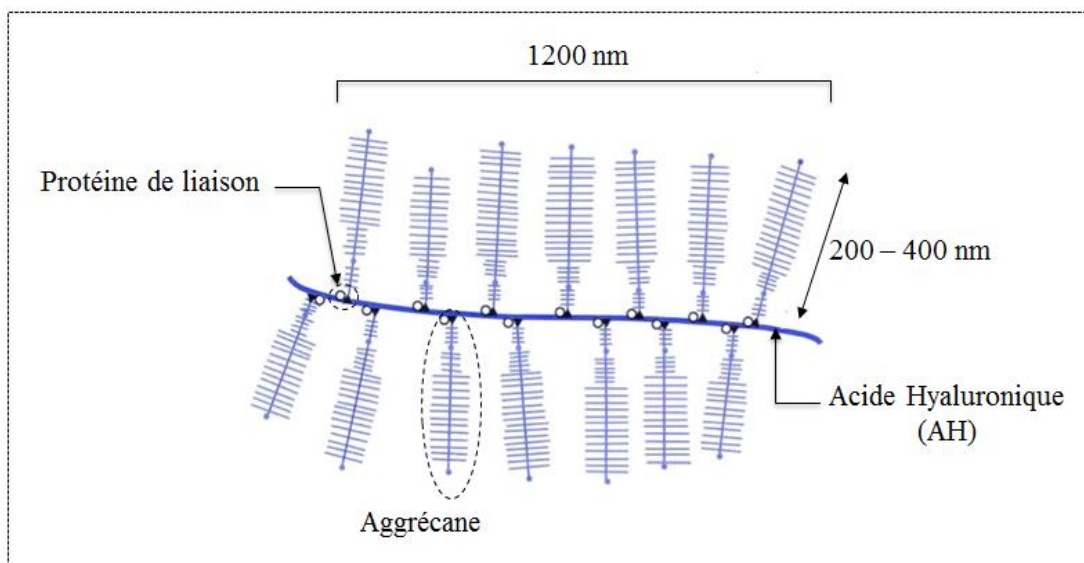


Figure 1.5: Structure d'une PG (adapté de (Nordin 2001))

f. Protéines non collagéniques

Parmi ces protéines, on peut citer la décorine, la biglycane, la fibromoduline, la lumican, qui sont des PG de plus petites tailles dans la MEC de la PC. On trouve également la protéine oligomérique du cartilage ou COMP (Ballock and O'Keefe 2003b; Salter 1998), la thrombospondine, la fibronectine, la ténascine, l'ostéonectine (Hunziker 1994). L'ostéopontine (OPN) est également une phosphoprotéine sécrétée par les chondrocytes de la PC et qui intervient dans la minéralisation (Reich, et al. 2005).

g. Enzymes : métalloprotéinases (MMP) et aggrécases

Des enzymes sont également présentes dans la matrice à savoir les métalloprotéinases (MMP) et les aggrécases. Les MMP sont des enzymes protéolytiques dépendantes du zinc (Alvarez, et al. 2000) et peuvent briser les liens peptidiques du collagène. Les MMP sont divisées en quatre catégories dont les collagénases efficaces pour cliver les hélices des fibrilles de collagène. Il existe trois types de MMP dans les PC chez l'homme : la MMP1 ou collagénase 1, la MMP8 ou collagénase 2, et la MMP13 ou collagénase 3. La MMP13 intervient dans la dégradation des collagènes de type II, X ainsi que de l'aggrécane et d'autres PG. De plus, parmi les enzymes de la MEC de la PC, on trouve des aggrécases appartenant à la famille des ADAMTS (*A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) qui dégradent les PG en particulier l'aggrécane. Plus spécifiquement, ADAMTS-4 (ou aggrécane 1) dégrade l'aggrécane et la

versicane, alors qu'ADAMTS-5 (ou aggrecanase 2) dégrade uniquement l'aggrecane (Cancel, et al. 2008).

1.1.3 Minéralisation et formation du nouvel os

La transformation du cartilage en os trabéculaire s'effectue à la jonction ostéochondrale pendant la croissance. La minéralisation physiologique est un processus complexe hautement régulé (Wang, et al. 2005). Elle comporte les étapes suivantes qui sont détaillées ci-après avec, dans l'ordre : la minéralisation du cartilage (Figure 1.6), l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, la dégradation de la MEC, l'angiogenèse, la formation du nouvel os et le remodelage subséquent de la matrice minéralisée en os (Ohashi, et al. 2002).

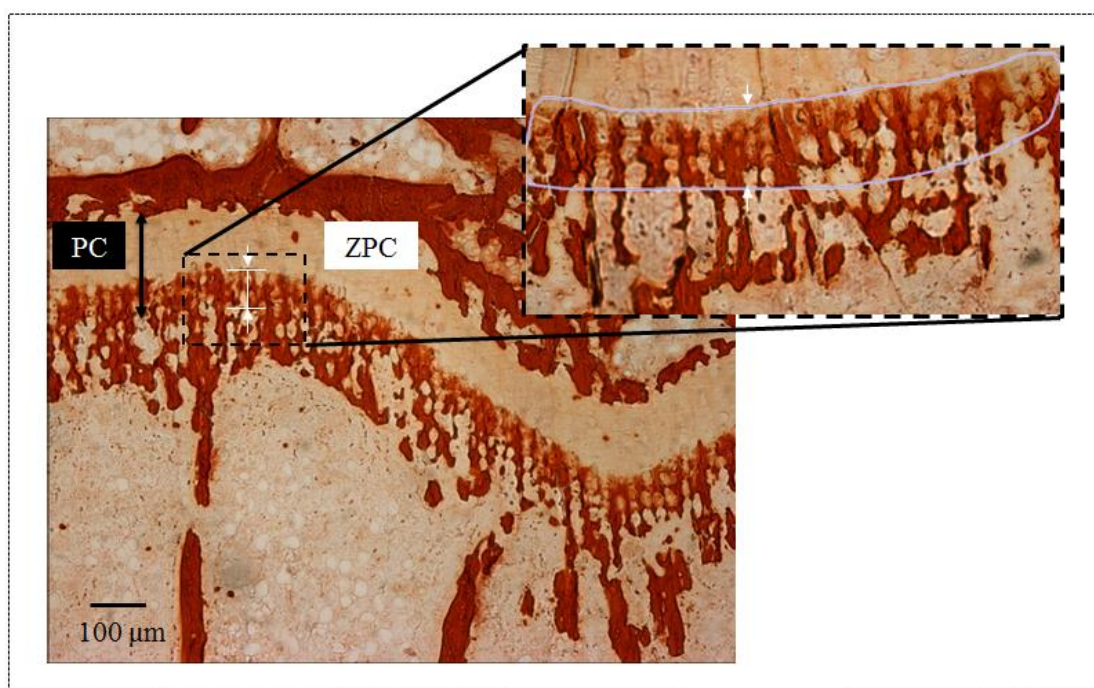


Figure 1.6: Minéralisation montrant la plaque de croissance (PC) et la zone de calcification provisionnelle (ZPC) (Tsai, et al. 2013), sur une lame de vertèbre de rat colorée à l'alizarine rouge (microscope optique grossissement X10)

1.1.3.1 Étapes de la minéralisation

a. Définition

La minéralisation est un procédé physico-chimique qui désigne le dépôt de minéraux de phosphate de calcium dans les os. Dans le cas de l'hydroxyapatite de formule chimique

$(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, il s'agit de la précipitation d'ions calcium, phosphate et hydroxyde. Pour ce faire, le produit de leurs activités ioniques doit dépasser le produit de solubilité (pour l'hydroxyapatite, $K_s = 10^{-57}$). Les concentrations ioniques de calcium et de phosphate diffèrent des concentrations totales à cause des complexations et des liaisons avec des protéines, et dépendent du pH du milieu. Avant la précipitation des ions, un processus de nucléation, qui requiert un apport en énergie, est nécessaire pour permettre aux ions de s'associer et de former une configuration stable contenant les éléments essentiels des futurs cristaux (Anderson 2003).

b. Localisation

La minéralisation a lieu au niveau de la matrice interterritoriale dans les stades les plus avancés d'hypertrophie (Hunziker, et al. 1987). La minéralisation du cartilage s'effectue sur les fibres de collagène de la matrice situées entre les colonnes distinctes de chondrocytes hypertrophiques le long des septa longitudinales et non entre les chondrocytes d'une même colonne (Ballock and O'Keefe 2003b). Les compartiments matriciels périceellulaire et territorial ne sont pas minéralisés. De plus, environ 60% des septa longitudinales sont détruites par l'activité des chondroclastes et ne sont donc pas destinées à être minéralisés.

1.1.3.2 Vésicules

Lors de la croissance endochondrale, le processus de minéralisation s'initie au niveau des chondrocytes hypertrophiques différenciés (Wang and Kirsch 2002). Ces derniers secrètent des vésicules présentes dans la MEC d'environ 100 nm de diamètre qui bourgeonnent par leur membrane plasmique. Cette origine paraît la plus probable car les composants des vésicules sont identiques à ceux des membranes plasmiques mais présentes en des proportions différentes (Golub 2009).

a. Composition des vésicules

Les vésicules contiennent un cœur de nucléation composé de phospholipides acides, de calcium, de phosphate inorganique et d'une protéine de transport de calcium appelée annexine (types II, V et VI) présente dans sa membrane bicouche lipidique (Wang and Kirsch 2002) ainsi qu'une variété d'intégrines et une phosphatase (PHOSPHO-1) (Mackie, et al. 2011). Les vésicules contiennent également des enzymes incluant la phosphatase alcaline (ALP) et des MMP pour réguler les inhibiteurs présents dans la MEC (Ballock and O'Keefe 2003b).

b. Rôles des vésicules

Les vésicules contiennent un environnement protégé permettant l'accumulation des ions formant le minéral (calcosphérulites), loin des PG qui sont des inhibiteurs de la nucléation minérale à cause de leurs charges électro négatives élevées. On pense que les vésicules jouent au moins deux rôles spécifiques dans la minéralisation (Golub 2009), détaillés ci-dessous :

- ✓ Le premier rôle des vésicules est une régulation du métabolisme du pyrophosphate, c'est à dire du ratio d'orthophosphate (Pi) par rapport au pyrophosphate (PPi) dans le fluide extracellulaire (Ballock and O'Keefe 2003b). En effet, le pyrophosphate (PPi) empêche la minéralisation de la matrice. Cette inhibition peut être contrecarrée via l'action de TNAP (*Tissue Non Specific Alkaline Phosphatase*) qui hydrolyse le PPi en donnant ainsi du Pi (deux molécules de Pi pour une molécule de PPi hydrolysée). Lorsque les niveaux extracellulaires de PPi augmentent dans la zone hypertrophique de la PC, les chondrocytes hypertrophiques différenciés y répondent en augmentant les niveaux de phosphatase alcaline afin d'hydrolyser PPi (Wang, et al. 2005).
- ✓ Le second rôle des vésicules et de ses composants (protéines, lipides) consiste à servir de sites de nucléation pour la formation des cristaux d'apatite (Cuisinier 1996). Les ions calcium Ca^{2+} entrent dans les vésicules à travers un canal d'annexine et le phosphate avec un transporteur sodium de type III dépendant du phosphate (Wang, et al. 2005). Calcium et phosphate s'associent pour former de l'apatite au sein des vésicules (Golub 2009).

c. Migration du minéral dans la MEC

Les cristaux d'apatite sont déposés de façon orientée de sorte que leur plus grande dimension soit parallèle à l'axe des fibrilles de collagène de la matrice. Le collagène sert d'échafaudage pour guider la croissance des cristaux qui remplissent ensuite l'ensemble de l'espace intra-fibrillaire. Encore des doutes subsistent quant à la façon dont le minéral formé dans les vésicules est transféré sur le collagène de la MEC (Golub 2009), et les mécanismes moléculaires qui réorganisent ce minéral sur les fibrilles de collagène de la MEC (Veis and Dorvee 2013).

1.1.3.3 Apoptose des chondrocytes hypertrophiques

L'apoptose désigne le mécanisme de mort cellulaire programmée, un processus qui s'avère nécessaire pour l'homéostasie de la plupart des organes dont la PC (Anderson and Shapiro 2010).

De nombreuses études ont énoncé que les chondrocytes hypertrophiques subissent l'apoptose, basé sur la détection de caractéristiques moléculaires associées à l'apoptose et non à des changements morphologiques (Mackie, et al. 2011). Chez les chondrocytes hypertrophiques qui ont terminé leur phase de différenciation terminale, on observe les changements suivants caractéristiques de l'apoptose : condensation de la chromatine nucléaire, diminution du volume cellulaire, et présence de bulles au niveau de la membrane plasmique. L'apoptose des chondrocytes hypertrophiques peut être provoquée par un mécanisme intrinsèque activé par de nombreux stimuli (hypoxie, stress oxydatif, ...) et extrinsèque via des protéines externes se reliant aux récepteurs de la membrane cellulaire (Anderson and Shapiro 2010). L'apoptose est accompagnée de l'activité d'enzymes appelées caspases qui l'initient et brisent les cellules avec une haute spécificité (Ballock and O'Keefe 2003b). En début de minéralisation, la présence de P_i et de taux élevés de calcium sous forme cationique (Anderson and Shapiro 2010) induit l'apoptose des chondrocytes et ostéoblastes (Wang, et al. 2005). Par ailleurs, l'apoptose des chondrocytes est entièrement contrôlée et varie en fonction du stade développemental, c'est à dire que davantage d'apoptose est observée lorsque le taux de croissance diminue (Chrysis, et al. 2002). Cette étape est importante pour permettre la calcification de la matrice qui sert ensuite de base à la formation de l'os par les ostéoblastes. Après calcification de la matrice, l'apoptose des chondrocytes fournit un espace permettant l'invasion des canaux vasculaires et des cellules de la moelle osseuse.

1.1.3.4 Angiogenèse et invasion vasculaire

La vascularisation est également une étape clé du processus de minéralisation qui implique un couplage entre chondrogenèse et ostéogenèse (Reich, et al. 2005). Les MMP dégradent la matrice cartilagineuse minéralisée afin de permettre la migration des cellules endothéliales et des facteurs de croissance accélérant l'angiogenèse (Reich, et al. 2005), ainsi que le recrutement des précurseurs des ostéoclastes et des progéniteurs des ostéoblastes (Staines, et al. 2012). En particulier, la MMP9 (ou gélatinase B) joue un rôle primordial pour la vascularisation (Reich, et al. 2005). De plus, la croissance des vaisseaux sanguins au sein de la PC requiert la présence du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF et de facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) entre autres (Anderson and Shapiro 2010; Reich, et al. 2005). VEGF est exprimé par les chondrocytes hypertrophiques, sous l'influence du gène Runx2. VEGF vise les cellules endothéliales (ostéoclastes, ostéoblastes) vasculaires en stimulant leur prolifération, leur

migration et la formation de vaisseaux sanguins. Plusieurs facteurs semblent réguler l'expression de VEGF. Les facteurs inhibant la maturation (comme PTHrP) empêchent également l'angiogenèse, et inversement (Ballock and O'Keefe 2003b). Par ailleurs, d'autres facteurs interviennent pour favoriser l'invasion vasculaire, tels que la protéine constitutive de la chromatine, HMGB1, également sécrétée par les chondrocytes dont le rôle consiste à attirer les cellules endothéliales, ou encore le ligand RANKL essentiel pour la différenciation des ostéoclastes (Mackie, et al. 2011).

1.1.3.5 Formation du nouvel os

La matrice cartilagineuse permet la formation de tissu spongieux primaire, qui est ensuite enlevé par des cellules résorbant la matrice, tels que les septoclastes et les ostéoclastes qui y accèdent via les vaisseaux sanguins (Colnot and Alliston 2010). Les ostéoclastes, ainsi que les enzymes de la MEC (MMPs et ADAMTs) dégradent la matrice minéralisée en créant un milieu acide riche en enzymes protéolytiques comme la cathepsine K (Colnot and Alliston 2010). Peu de temps après sa formation, le nouvel os de la métaphyse avec des inclusions cartilagineuses, est remodelé par l'action concomitante des ostéoclastes et des ostéoblastes afin de former l'os trabéculaire (Anderson and Shapiro 2010) (Figure 1.7).

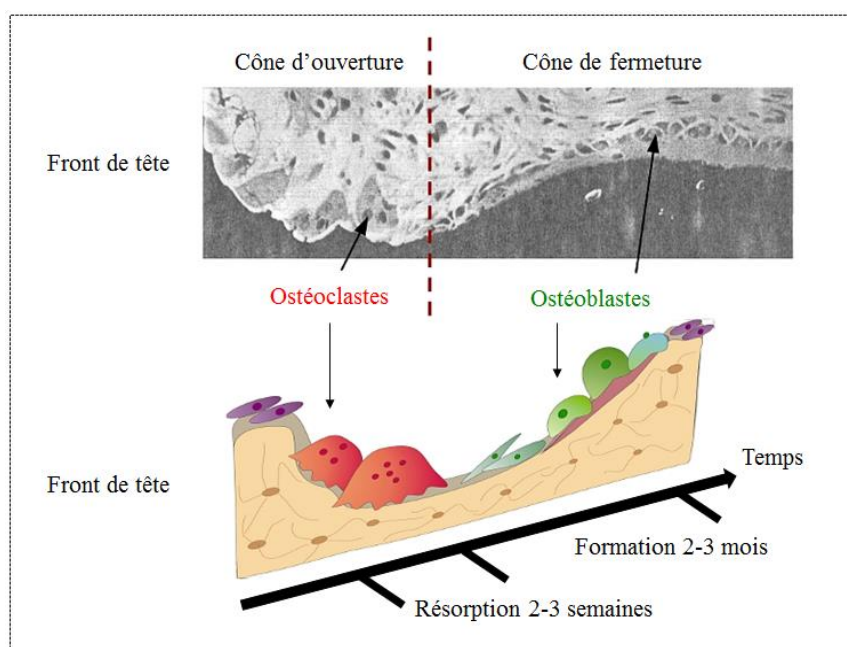


Figure 1.7: Unité de remodelage osseux montrant le couplage temporel entre ostéoclastes et ostéoblastes (adapté de <https://www.math.duke.edu/mathbio/projects/ryser.html>)

1.1.4 Régulation de la croissance

L'activité de la PC est sujette à de nombreuses régulations positives et négatives entre des facteurs d'origine différente (endocrine, paracrine, autocrine). Au cœur de la régulation de la croissance, se trouve la boucle de régulation Ihh (*Indian Hedgehog*) / PTHrP (*Parathyroid hormone-related peptide*) (Kronenberg 2003; Li, et al. 2011; Mackie, et al. 2008). La PTHrP favorise la prolifération des chondrocytes et empêche leur maturation et hypertrophie. En particulier, elle agit en régulant la transcription du collagène de type X sécrété par les chondrocytes hypertrophiques (O'Keefe, et al. 1997). D'autres facteurs ont été identifiés et jouent également un rôle pour permettre la croissance à savoir (Figure 1.8) :

- ✓ Les hormones : triiodothyronine (T_3), œstrogènes, hormone de croissance (GH)
- ✓ Les facteurs de croissance : IGF-1, FGF, TGF β
- ✓ Les facteurs de transcription : Gli3, Sox9, Runx2, MEF2C et HDAC4
- ✓ Les autres facteurs impliqués : Wnt, BMP, CamKII, acide rétinolique

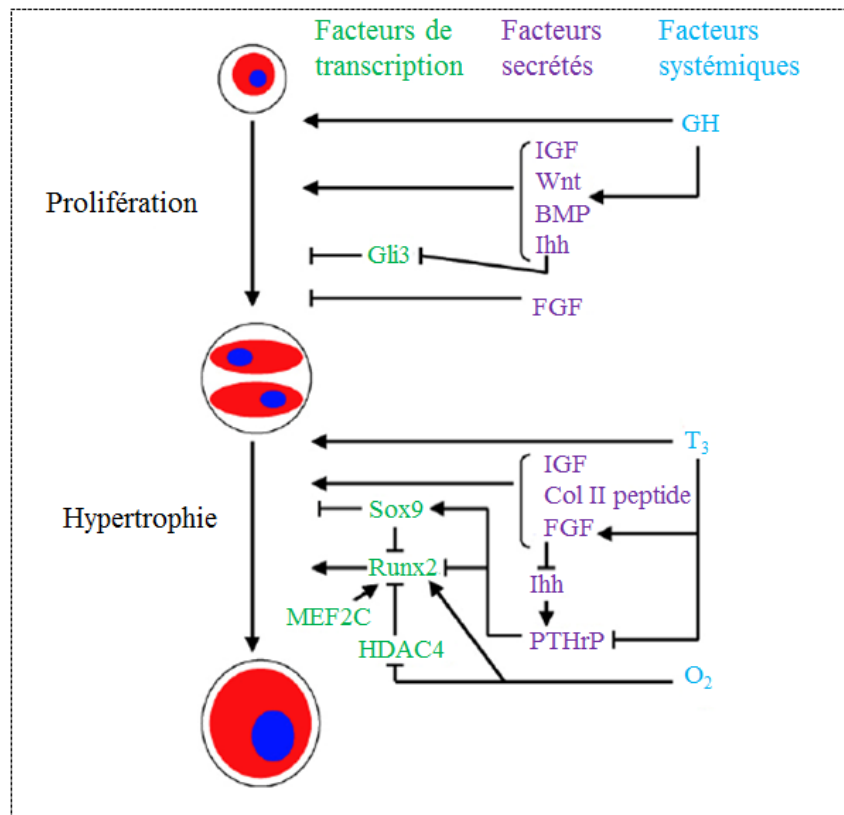


Figure 1.8: Régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes de la PC (adapté de (Mackie, et al. 2008))

1.1.5 Fin de croissance et sénescence de la PC

À l'approche de la maturité squelettique, le taux de croissance diminue suite à une réduction du taux de prolifération des chondrocytes de la PC (Nilsson and Baron 2004). Par conséquent, le taux d'avancement du front d'ossification est supérieur au taux de renouvellement des chondrocytes de la PC. Cette diminution de prolifération de la PC est associée à des changements structurels au sein de la PC tels que la diminution des hauteurs des zones proliférative et hypertrophique ainsi que de la taille des cellules et de leur densité (Ballock and O'Keefe 2003b; Li, et al. 2011). Cette sénescence programmée de la PC est le résultat de mécanismes intrinsèques à la PC (Nilsson and Baron 2004; Ola Nilsson 2005).

Chez l'homme, la PC est complètement résorbée ce qui conduit à la fusion de l'épiphyse (second centre d'ossification) et de la métaphyse (premier centre d'ossification) des os longs et vertèbres. La fusion semble s'effectuer spontanément après l'arrêt de croissance suite à l'épuisement des réserves des cellules présentes dans la PC. Les hormones jouent un rôle clé, en particulier les œstrogènes qui accélèrent le processus de sénescence de la PC (Mackie, et al. 2011; Ola Nilsson 2005).

1.2 Disque Intervertébral

1.2.1 Structure et composition

Le disque intervertébral relie deux vertèbres adjacentes de la colonne vertébrale (Figure 1.9). Il est constitué d'un noyau pulpeux (nucleus pulposus) entouré d'un anneau fibreux (annulus fibrosus) (Figure 1.9).

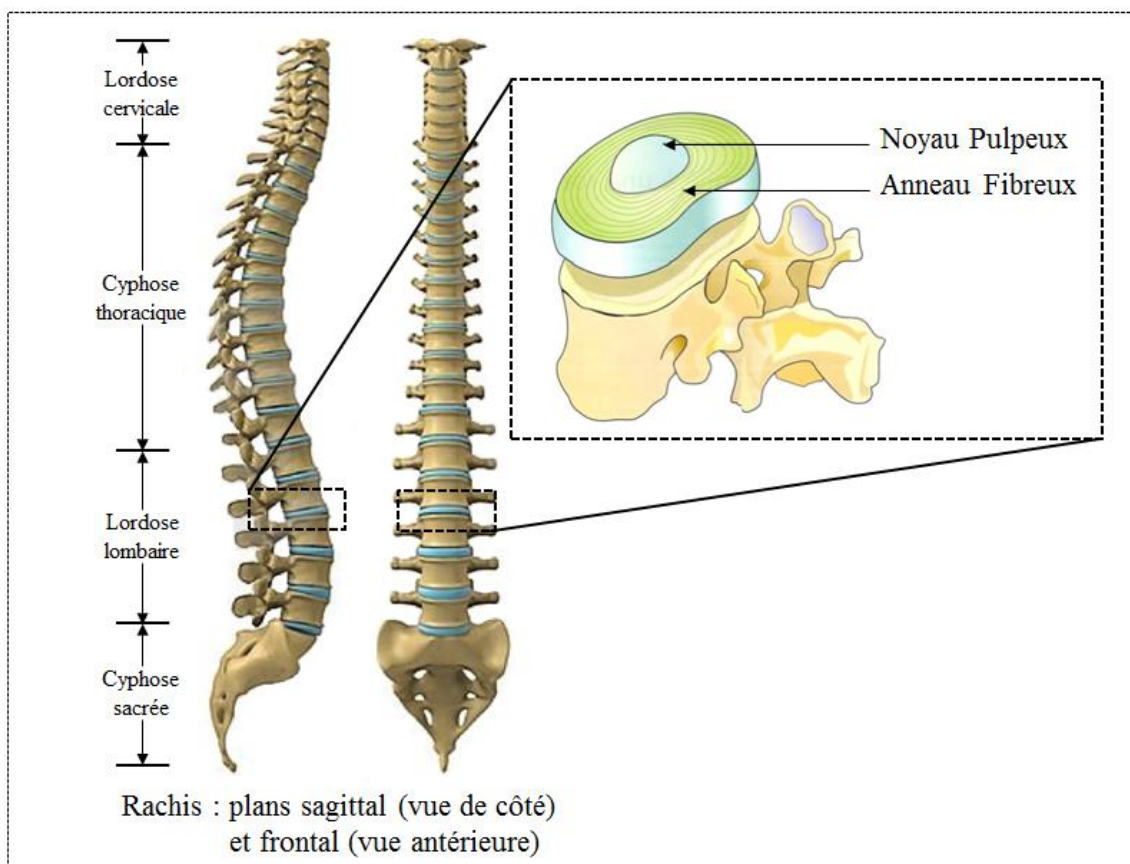


Figure 1.9: Rachis dans les plans frontal (vue antérieure) et sagittal (adapté de <http://www.dreamstime.com/stock-image-human-spine-image5498771>) et exemple de disque intervertébral (adapté de (White and Panjabi))

1.2.1.1 Noyau pulpeux

Le noyau gélatineux est composé de chondrocytes, de protéoglycanes et de fibres de collagènes de types I et II (pourcentages respectifs de 15% et 85%) (Hutton, et al. 1998). Le noyau est riche en aggrécane qui est la PG la plus abondante (Roughley, et al. 2014).

1.2.1.2 Anneau fibreux

L'anneau forme un collier de tissu de collagène autour du noyau. Il est composé de couches ordonnées de fibres de collagène de type I principalement (Roughley, et al. 2014) contenant des fibrochondrocytes dans sa partie interne et des cellules fibroblastiques dans sa partie externe (Walsh and Lotz 2004).

1.2.1.3 Aggrécane

L'aggrécane appartient à la famille des PG et est la PG la plus abondante du disque (Sivan, et al. 2014). La protéine centrale de l'aggrécane, l'acide hyaluronique (AH), lui permet de s'agréger, lui donnant un poids moléculaire important et une large répartition spatiale empêchant ainsi sa diffusion à l'extérieur des tissus. Ses chaînes de GAG sont constituées de sulfate de chondroïtine (CS) et de sulfate de kératane (KS). Les chaînes sulfatées de CS et de KS confèrent au disque une grande résistance aux chargements en compression (Sivan, et al. 2014) grâce à ses propriétés osmotiques par ses capacités à gonfler en se gorgeant de molécules d'eau. Outre les chaînes de GAG, l'aggrécane contient également trois régions globulaires G1, G2 et G3, ainsi qu'un domaine interglobulaire entre G1 et G2 (Figure 1.10). Le domaine G1 est responsable de l'attachement à l'acide hyaluronique. Le domaine interglobulaire est le plus susceptible d'être clivé par la plupart des protéinases contenues dans la matrice extracellulaire, tels que les MMP et aggrécánases (Sivan, et al. 2014).

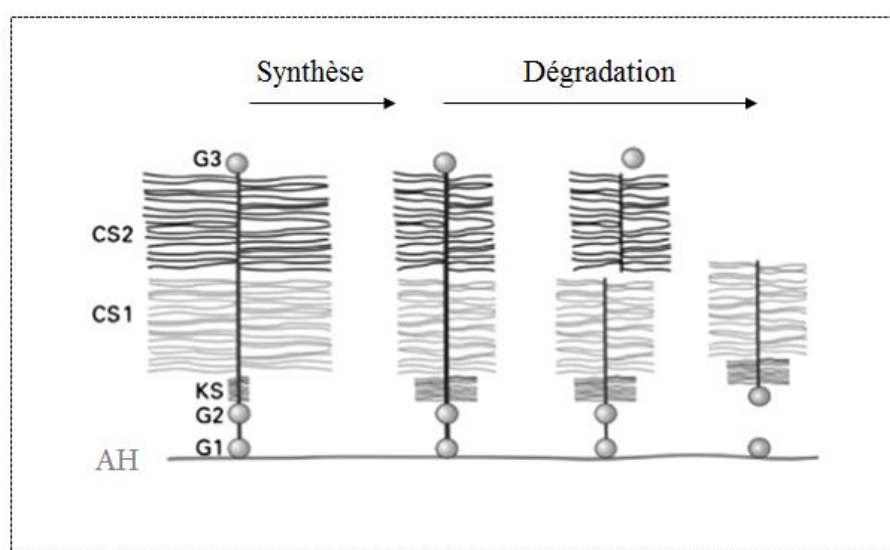


Figure 1.10: Synthèse et dégradation de l'aggrécane (adapté de (Sivan, et al. 2014))

1.2.1.4 Intégrité du disque

L'intégrité du disque est basée sur la capacité de ses cellules constitutrices de produire du collagène et des PG dans des proportions et structures adéquates (Hutton, et al. 1998).

1.2.2 Fonction mécanique

Le disque intervertébral agit comme un absorbeur de choc et permet également le mouvement entre les différents niveaux vertébraux. Suite à des forces élevées en compression, la pression hydrostatique dans le disque augmente, tout comme les contraintes mécaniques sur les fibres du disque, les PC et l'os subchondral (Figure 1.11). La pressurisation du disque est possible grâce aux fibres de collagène de l'anneau qui développent des contraintes en tension (Lotz, et al. 1998). Par conséquent, le collagène joue un rôle important car le tissu fibreux ainsi formé contribue à une résistance élevée du disque à la compression et la tension (Hutton, et al. 1998). Ces changements sont accompagnés d'exsudation de fluide (Hutton, et al. 1998) à travers les PC cartilagineuses semi-perméables (Lotz, et al. 1998).

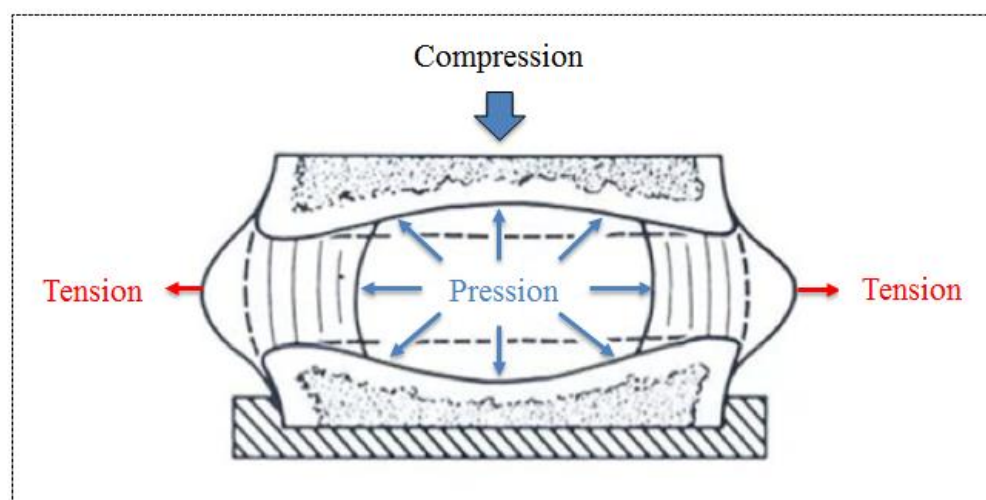


Figure 1.11: Comportement d'un disque sain en compression (adapté de (White and Panjabi))

1.2.3 Dégénérescence

La dégénérescence discale survient naturellement avec l'âge et provient de la modification de l'équilibre du processus de remodelage du disque (Hutton, et al. 2000). Une dégénérescence précoce peut être reliée à des facteurs génétiques, mécaniques ou environnementaux (Sivan, et al. 2014). Au niveau macroscopique, la dégénérescence discale avancée est associée à des symptômes de douleur tels que les douleurs lombaires (Stokes and Iatridis 2004) ainsi qu'une perte de mobilité.

1.2.3.1 Caractéristiques morphologiques et structurelles

Les premiers signes de dégénérescence du disque (Figure 1.12) se manifestent par une perte de hauteur du disque intervertébral excédant les pertes normales causées par le cycle circadien. D'autres signes morphologiques incluent une coalescence du nucleus prenant un aspect fibreux (Hutton, et al. 1998) et perdant sa démarcation avec l'anneau (Stokes and Iatridis 2004), un boursoufflement du disque (Hutton, et al. 2000), des fissurations de l'anneau (Hutton, et al. 2000), une diminution du nombre de fibres de l'anneau avec un espace supérieur entre chaque fibre (Stokes and Iatridis 2004). La dégénérescence est associée à une perte d'hydratation, en particulier dans le noyau, de 90% chez l'enfant à 70% chez une personne âgée (Stokes and Iatridis 2004).

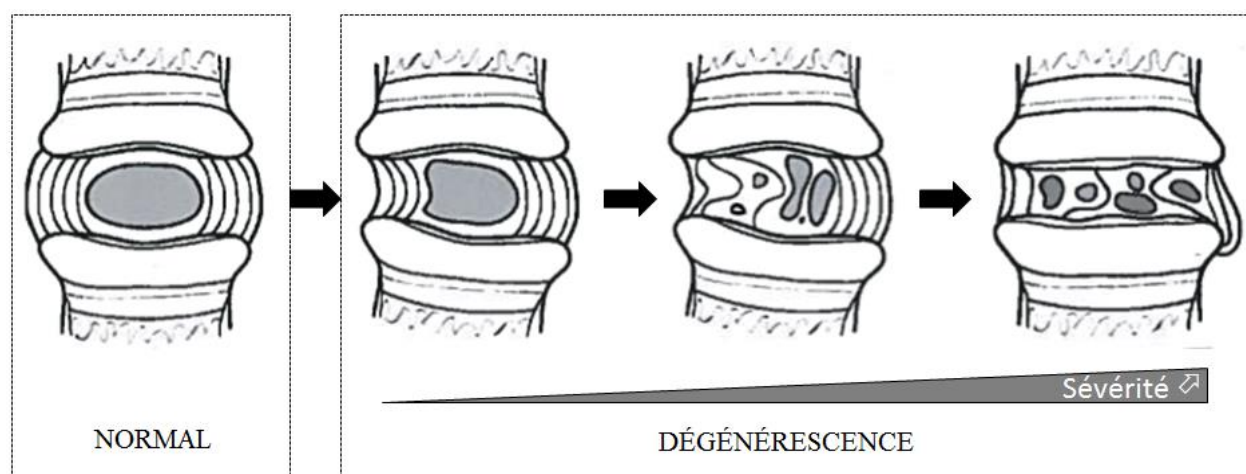


Figure 1.12: Dégénérescence discale (adapté de (Chan, et al. 2011))

Au niveau structurel, la dégénérescence discale semble s'initier dans le noyau (Hutton, et al. 1998). Elle est accompagnée d'une perte de protéoglycanes (en particulier l'aggrécane) du noyau. Tant que les molécules d'aggrécane sont clivées mais restent dans le noyau, les fragments de chaînes sulfatées conservent leur rôle de résistance à la compression (Sivan, et al. 2014). Cependant, les plus petits fragments clivés d'aggrécane sont plus mobiles et plus susceptibles d'être perdus par diffusion hors du noyau (Roughley, et al. 2014), contribuant à l'accélération de la dégénérescence (Sivan, et al. 2014). De plus, on observe une diminution de collagène de type I dans le noyau et l'intérieur de l'anneau (Hutton, et al. 2000).

1.2.3.2 Effet de l'âge et du vieillissement

La cause la plus naturelle de la dégénérescence discale est le vieillissement (Hutton, et al. 2000). Avec l'âge, les aggrécans sont dégradés par protéolyse mais aussi par glycation non enzymatique, rendant le domaine G1 non fonctionnel, c'est-à-dire incapable de se lier à l'acide hyaluronique donc l'empêchant de s'agréger (Roughley, et al. 2014).

1.2.3.3 Causes mécaniques comme pathogénèse

Les causes mécaniques de dégénérescence discale sont basées sur deux courants de pensée plausibles mais distincts (Stokes and Iatridis 2004).

Le premier courant indique que les chargements excessifs dépassant les valeurs physiologiques pourraient causer une dégénérescence discale. Cette hypothèse est celle de la fatigue et des déchirures accumulées au cours du temps, c'est-à-dire que les chargements excèdent la capacité de récupération du disque (Iatridis, et al. 2006) et, sur du long terme, produisent des blessures qui s'aggravent et affaiblissent le disque selon un cercle vicieux (Stokes and Iatridis 2004). De plus, les chargements excessifs et répétitifs produisent des microfissures dans les PC cartilagineuses, conséquemment affectant la diffusion des nutriments dans le disque intervertébral (Lotz, et al. 1998). De plus, pendant la compression statique, le fluide est exsudé, transportant et compactant un plus grand nombre d'ions chargés dans un plus petit volume, ce qui augmente la densité de charge électro négative des PG. Ainsi des protons H^+ sont attirés et concentrés créant une augmentation de pH dans la MEC, ce qui conduit à une diminution de la capacité d'agrégation des PG (Hutton, et al. 1998).

Le second courant de pensée stipule que la dégénérescence serait due à la réduction de mouvement causée par le chargement. Réduire le mouvement pourrait aussi affaiblir le disque par sous-stimulation soit du métabolisme cellulaire soit par un transport altéré des nutriments et métabolites (Iatridis, et al. 2006; Stokes and Iatridis 2004). Un exemple concret est celui d'un patient ayant subi une arthrodèse ou fusion discale : les niveaux discaux adjacents sont alors soumis à une amplitude de mouvement restreinte qui pourrait être à l'origine d'une cascade dégénérative malgré le processus de remodelage et d'adaptation (Stokes and Iatridis 2004).

1.2.3.4 Altération des propriétés mécaniques

Les changements dans la composition ou la morphologie du disque conduisent à des modifications de propriétés biomécaniques du disque (Iatridis, et al. 1999). En particulier, les altérations les plus prononcées ont lieu dans le noyau avec une augmentation du module de cisaillement d'un facteur 8 ainsi qu'une diminution drastique de pression (Iatridis, et al. 2006). Dans l'anneau, le module de compression double, associé à une diminution importante du ratio de Poisson et des perméabilités radiales ainsi qu'une augmentation de la perméabilité axiale (Iatridis, et al. 2006).

1.2.4 Remodelage et adaptation du disque à l'environnement mécanique

Le disque possède une capacité d'adaptation à son environnement mécanique, et ce, en fonction des chargements qui lui sont appliqués, de leur durée d'application ainsi que de différents autres facteurs intrinsèques et extrinsèques. Iatridis et coll. ont proposé cinq scénarios de mécanismes hypothétiques permettant d'expliquer la réponse biologique de remodelage et de réparation du disque intervertébral soumis à des chargements (Iatridis, et al. 2006). Ces scénarios sont définis en fonction des réponses des gènes anaboliques et cataboliques ainsi que du niveau résultant de protéines. Par conséquent, ils obtiennent les possibilités suivantes :

- ✓ Homéostasie : gènes anaboliques, cataboliques et niveau de protéines équivalents;
- ✓ Réparation : augmentation temporaire des gènes anaboliques et cataboliques qui entraîne une augmentation temporaire de protéines permettant la réparation subséquente du disque;
- ✓ Remodelage de type anabolique : augmentation plus importante des gènes anaboliques par rapport aux cataboliques, conduisant à une augmentation globale du niveau protéique par rapport au contrôle;
- ✓ Remodelage de type catabolique : augmentation plus importante des gènes cataboliques par rapport aux anaboliques, conduisant à une réduction globale du niveau protéique par rapport au contrôle;
- ✓ Dommage/ blessure : augmentation simultanée de gènes anaboliques et cataboliques, ne conduisant à aucune réponse protéique, ce qui conduit à un maintien d'un niveau élevé de gènes anaboliques et cataboliques par rapport au contrôle.

1.3 Environnement mécanique et croissance

L'environnement mécanique est nécessaire pour assurer une croissance normale des os, tissus vivants en perpétuel renouvellement. Il a donc un effet direct sur la croissance, ainsi que l'architecture osseuse.

1.3.1 Remodelage osseux

Le concept de Roux date de 1881 et stipule que le tissu osseux s'adapte à un mécanisme ou stimulus externe via une autorégulation quantitative au niveau cellulaire microscopiquement. Ce concept est la base de l'idée de remodelage osseux (Villemure 2000).

1.3.1.1 Loi de Wolff

Le remodelage osseux a lieu tout au long de la vie chez tous les individus à tout âge, et désigne l'adaptation active de l'os à son environnement mécanique selon la loi de Wolff (Turner 1998). D'après la loi de Wolff, les os modifient leur forme, masse et architecture interne pour mieux résister aux contraintes mécaniques qu'ils subissent (Villemure and Stokes 2009a). En effet, des chargements élevés en compression entraînent une augmentation de masse osseuse et inversement une diminution de chargement entraîne une perte osseuse (Reich, et al. 2008). Typiquement, la pratique régulière de sport favorise l'épaississement de l'os cortical, en comparant les avant-bras (radius et ulna) dominants *versus* non-dominant d'un joueur de tennis (Ducher and Blimkie 2006). À l'inverse, des pertes osseuses sont typiquement observées suite à une sous-utilisation mécanique due à un repos forcé, un voyage dans l'espace en absence de gravité ou encore d'autres scénarios avec une diminution de charge mécanique sur les os (Reich, et al. 2008).

1.3.2 Modulation de croissance : principe de Hueter-Volkmann

La modulation de croissance s'applique spécifiquement aux os en croissance selon le principe de Hueter-Volkmann (Aronsson, et al. 1999; Mente, et al. 1999). En effet, ce principe stipule que la compression réduit la croissance selon la loi de Hueter (1862). Inversement une réduction de compression augmente la croissance d'après la loi de Volkmann (1869) (Villemure 2000). De nombreuses études *in vivo* sur plusieurs animaux et sites osseux ont apporté des preuves scientifiques à ce principe (Cancel, et al. 2008; Mente, et al. 1999; Valteau, et al. 2011), en

particulier les travaux de Stokes et coll. (Stokes, et al. 2006; Stokes, et al. 2005a; Stokes, et al. 2002).

1.3.3 Cercle vicieux et progression des déformations avec la croissance

Une déformation initiale de la colonne vertébrale entraîne le chargement asymétrique des vertèbres et des disques. Cette asymétrie engendre des forces asymétriques (supérieures du côté concave par rapport au côté convexe) qui accentuent les déformations menant à l'augmentation de l'asymétrie des chargements. Ce chargement asymétrique à son tour cause une asymétrie de croissance qui va accentuer la déformation locale ainsi que la cunéiformisation des vertèbres et des disques (Aronsson, et al. 1999). Le phénomène auto-entretenu constitue un cercle vicieux qui mène à l'aggravation globale des déformations (Figure 1.13) (Aronsson, et al. 1999). Le cercle vicieux, basé sur la modulation mécanique de la croissance, permet d'expliquer la progression des déformations musculosquelettiques avec la croissance (Castelein 2005; Mente, et al. 1999).

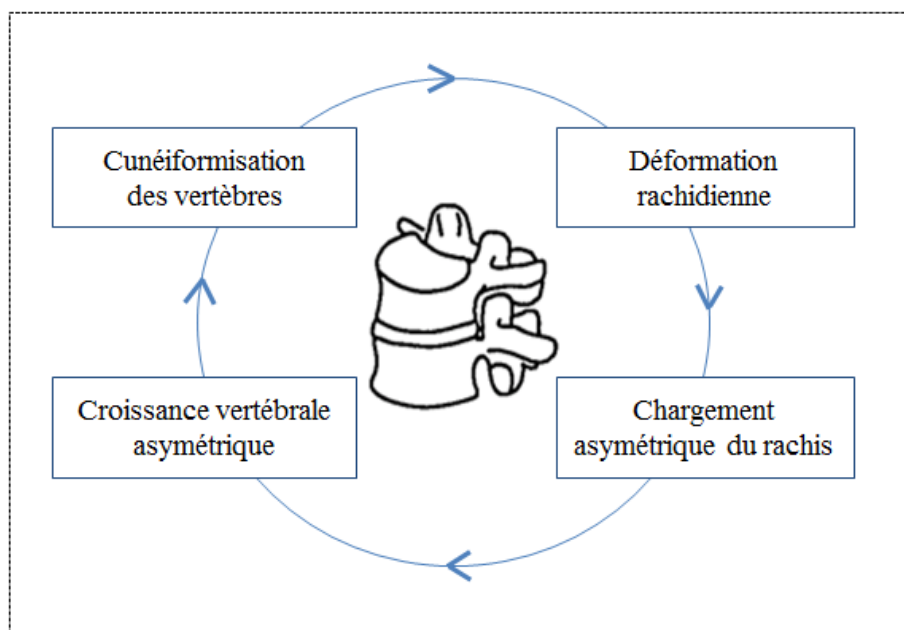


Figure 1.13: Cercle vicieux expliquant la progression des déformations (adapté de (Aronsson, et al. 1999))

Le cercle vicieux ici traité avec l'exemple de la colonne vertébrale peut être également généralisé aux os longs en croissance.

1.3.4 Déformations musculosquelettiques progressives

Les déformations musculosquelettiques progressives constituent des pathologies qui progressent au fur et à mesure de la croissance osseuse. Les sections suivantes présentent des exemples de ces pathologies, constituant les applications cliniques possibles des travaux présentés dans cette thèse.

1.3.4.1 Scoliose

La scoliose est une déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale, en particulier dans le plan frontal (Figure 1.14). Les déformations scoliotiques impliquent une angulation des vertèbres et des disques intervertébraux (Stokes, et al. 2013). On distingue plusieurs types de scoliose avec des physiopathologies et étiologies distinctes. Parmi ces pathologies, selon l'âge de survenue de la déformation du rachis, on identifie les scolioses précoces qui apparaissent avant l'âge de 5 ans (Akbarnia, et al. 2012; Fletcher and Bruce 2012) et les scolioses adolescentes dont la scoliose idiopathique adolescente (SIA). Les courbures rachidiennes progressent rapidement lors de la croissance et la sévérité des courbures est quantifiée par l'angle de Cobb. Le choix du traitement à adopter est déterminé en fonction des valeurs des angles de Cobb, du potentiel de croissance du patient et de la progression récente de sa courbure (Rowe, et al. 1997).

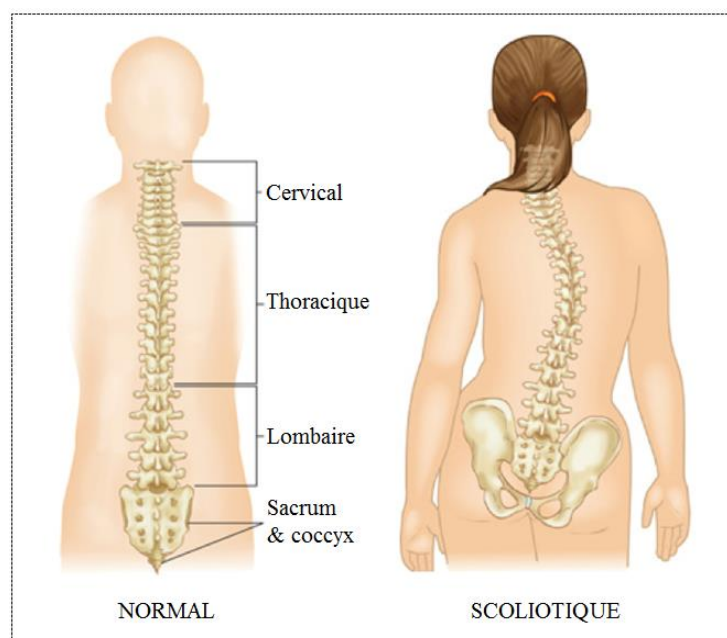


Figure 1.14: Plan frontal vue postérieure d'un patient normal (gauche) *versus* scoliotique (droite) avec une scoliose thoracique droite (adapté de <http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=A00615>)

a. Scoliose précoces (EOS)

Il s'agit d'une pathologie sévère, complexe, et une déformation progressive de la colonne vertébrale et du thorax. Cette pathologie est fréquemment associée à un syndrome d'insuffisance thoracique chez les patients (Akbarnia, et al. 2012; Skaggs, et al. 2013). Les scolioses précoces regroupent tous types d'étiologie incluant les scolioses neuromusculaires, congénitales, syndromiques et idiopathiques de l'enfant (Fletcher and Bruce 2012). Chez ces patients à cause de leur jeune âge, il est primordial de retarder les interventions chirurgicales lourdes donc d'utiliser des traitements les plus conservateurs possibles (corset, plâtre) (Fletcher and Bruce 2012). L'objectif de traitement n'est pas seulement de contrôler la progression de la déformation mais aussi de minimiser les déformations thoraciques et d'améliorer la fonction pulmonaire (Akbarnia, et al. 2012). Si une chirurgie s'avère nécessaire, différentes options sans fusion sont possibles et seront présentées dans la section 1.3.5 ci-après.

b. Scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA)

La scoliose idiopathique adolescente (SIA) touche 1 à 3 % de la population, en particulier les jeunes adolescentes de 10 à 16 ans (Rowe, et al. 1997). Son étiologie demeure inconnue et elle est supposée multifactorielle. Cependant, ses pathomécanismes ont été partiellement élucidés (Burwell, et al. 2009; Castelein 2005; Kouwenhoven and Castelein 2008; Leboeuf, et al. 2008; Lowe, et al. 2000). Classiquement, elle est traitée par des traitements conservateurs par corsets lorsque l'angle de Cobb est relativement faible et inférieur à 45° (Pham, et al. 2007; Rowe, et al. 1997; Schiller, et al. 2010). Pour des courbures sévères, seules les chirurgies lourdes avec tiges et vis sont utilisées. Pour des courbures modérées (entre 20 et 45° d'angle de Cobb), l'option des implants sans fusion s'avère la plus avantageuse et conservatrice (Akbarnia, et al. 2012; Newton, et al. 2008; Skaggs, et al. 2013). Elle sera discutée ci-après dans la section 1.3.5.

1.3.4.2 Cyphose de Scheurmann

Cette condition touche principalement les enfants et adolescents pendant des périodes de forte croissance. Cette maladie est causée par une ostéochondrite caractérisée par un défaut de vascularisation des noyaux d'ossification primaire ou secondaire. Cette hypercyphose thoracique résulte d'une asymétrie de croissance des vertèbres thoraciques dans le plan sagittal. Par conséquent, l'angle postérieur est supérieur à l'angle antérieur, donc les vertèbres développent des courbures locales dans le même sens (Stokes 2002).

1.3.4.3 Genu varum/valgum

Ces déformations affectent l'articulation du genou et se produisent suite à des chargements asymétriques sur les plaques de croissance. Un *genu varum* est caractérisé par une angulation médiale : les jambes sont arquées vers l'extérieur. Le *genu valgum* donne aux jambes une forme en X (Salenius and Vankka 1975).

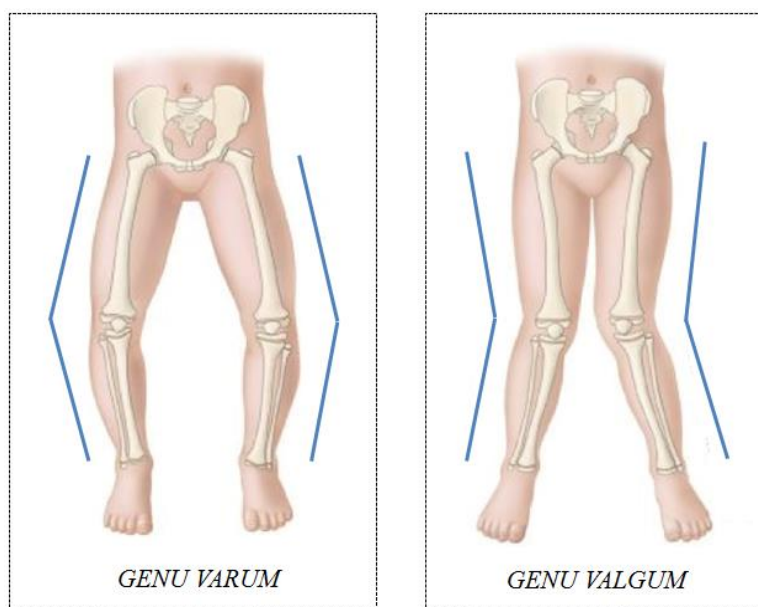


Figure 1.15: *Genu varum/valgum* (adapté de <http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?12/10/12453>)

1.3.4.4 Maladie de Blount ou tibia vara infantile

Il s'agit d'un défaut de croissance au niveau de la partie supérieure interne tibia, ce qui a pour conséquence de l'arquer, créant une déformation en varus. Cette pathologie est aussi connue comme un « tibia vara » et elle est bilatérale dans 60% des cas. Cette maladie est progressive et l'angulation s'accroît avec la croissance. Son étiologie est expliquée par une compression anormale sur la partie médiale des PC proximales du tibia (Bries, et al. 2012; Greene 1993). Les traitements peuvent être conservateurs par port d'orthèse, ou chirurgicaux par ostéotomie et/ou épiphysiodèse (Figure 1.16).

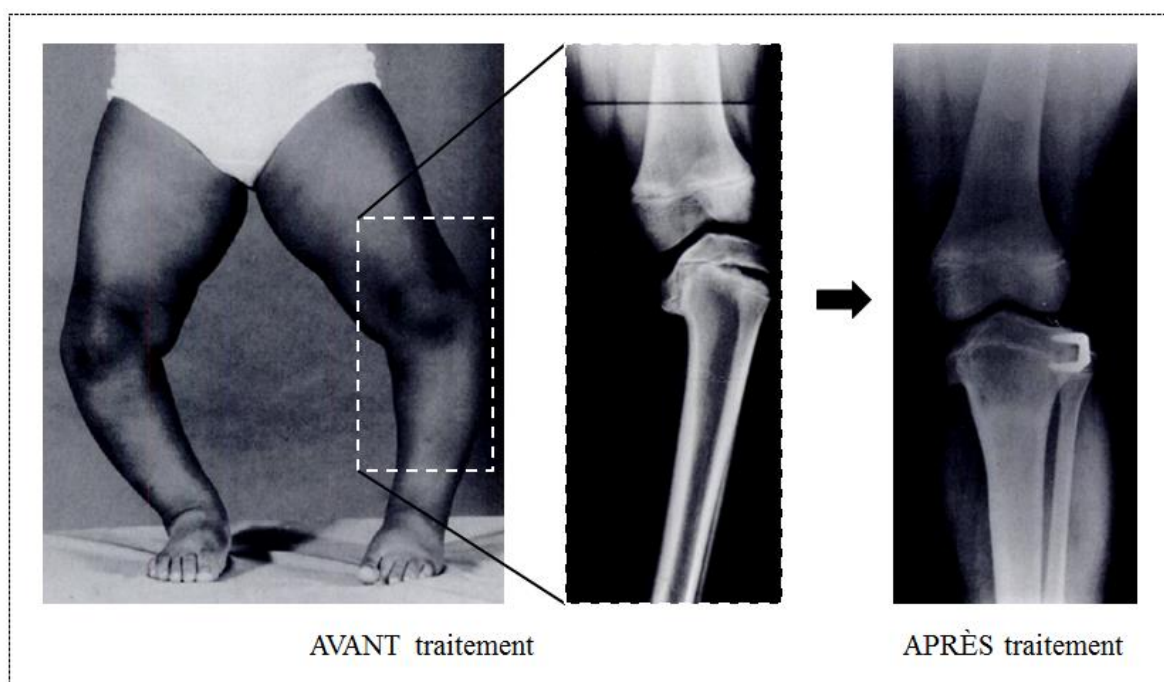


Figure 1.16: Patient avec la maladie de Blount, avant et après traitement par ostéotomie tibiale et épiphysiodèse (adapté de (Greene 1993))

1.3.4.5 Asymétrie et inégalité de longueur des membres inférieurs

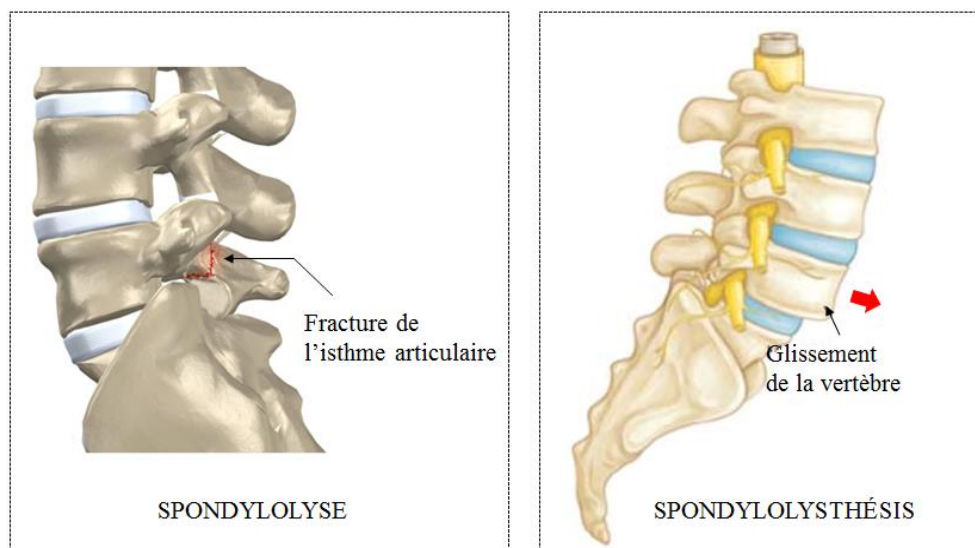
Les inégalités de longueur des membres inférieurs peuvent être constitutionnelles ou acquises et touchent le tibia ou le fémur. Les traitements sont conservateurs par port de semelle lorsque la différence est inférieure à 2 cm. Pour des inégalités plus importantes comprises entre 2 et 5 cm, la correction peut s'effectuer chirurgicalement par épiphysiodèse chez les patients avec un potentiel de croissance actif (Gorman, et al. 2009).

1.3.4.6 Spondylolyse et spondylolisthésis

La spondylolyse et la spondylolisthésis sont deux pathologies affectant le rachis lombaire, en particulier la 5^{ème} vertèbre lombaire car elle supporte davantage de poids (LeVeau and Bernhardt 1984). Ces pathologies sont distinctes mais peuvent également être simultanément présentes chez un patient.

La spondylolyse désigne le détachement de la partie postérieure et antérieure d'une vertèbre ; « lyse » faisant référence à la fracture de la vertèbre (Figure 1.17).

Le spondylolisthésis est un glissement permanent d'une vertèbre par rapport à une autre (Stokes 2002) (Figure 1.17). L'intégrité des corps vertébraux est maintenue lorsqu'elle n'est pas accompagnée de spondylolyse. Elle est causée par une dégénérescence des structures environnantes telles que les ligaments ou le disque intervertébral.



Ces pathologies sont fréquemment observées chez les athlètes pratiquant la gymnastique, le ballet ou le football à cause des chargements importants cycliques en hyperextension (LeVeau and Bernhardt 1984).

1.3.5 Nouveaux traitements sans fusion pour la scoliose

1.3.5.1 Principe

Le principe de traitement est basé sur le principe de modulation de croissance. Il consiste à exploiter le potentiel de croissance pour appliquer des chargements mécaniques contrôlés afin de renverser les courbures scoliotiques lors de la croissance de l'individu (Newton, et al. 2008). Concrètement, il s'agit d'appliquer de la compression sur la partie convexe de la vertèbre pour ralentir la croissance (Skaggs, et al. 2013) et/ou de la tension sur sa partie concave afin d'accélérer la croissance (Newton, et al. 2008).

1.3.5.2 Avantages

Ces nouvelles techniques permettent de réduire les risques de complication reliés à des chirurgies invasives, ainsi que de conserver un maximum de mobilité rachidienne (Akbarnia, et al. 2012). En effet, ces implants évitent l'enlèvement du disque intervertébral et la fusion subséquente des vertèbres adjacentes instrumentées (Fletcher and Bruce 2012; Hunt, et al. 2010). Non seulement la fusion des disques diminue grandement la mobilité de la colonne, mais un risque additionnel d'atteinte pathologique de segments adjacents est présent chez les patients scoliotiques traités par des instrumentations lourdes (Samdani, et al. 2014; Stokes, et al. 2013). Également est notée la calcification de la plaque de croissance ce qui altère le transport des nutriments vers le disque (Stokes, et al. 2013). Par conséquent, il convient de vérifier que les implants sans fusion n'entraînent pas de dégénérescence discale précoce.

1.3.5.3 Classification des traitements sans fusion

Skaggs et coll. ont classifié les différents traitements existants en définissant trois grandes catégories : les implants sans fusion en distraction (tiges coulissantes, VEPTR, tiges hybrides de croissance), ceux en compression (agrafes, vis et ligaments), et enfin ceux qui guident la croissance (Luque Trolley, Schilla) (Skaggs, et al. 2013). La seconde catégorie est celle qui concerne les applications de ce projet de recherche.

1.3.5.4 Implants sans fusion en compression

Contrairement au VEPTR ou aux tiges coulissantes, les implants ne requièrent pas de multiples chirurgies afin d'ajuster l'allongement de tiges (Fletcher and Bruce 2012). Parmi ces implants, on trouve ceux de type agrafes plus ou moins rigides (Hunt, et al. 2010), ou ancres et ligaments (Betz, et al. 2005; Schmid, et al. 2008) développés pour le traitement des SIA et des EOS (Figure 1.18). Samdani et coll. ont regardé les effets de vis et ligaments sur une période de deux ans sur onze patients scoliotiques. Les résultats sont encourageants car ils ont montré que la procédure peut être réalisée de façon sécuritaire et conduisent à la correction des déformations (Samdani, et al. 2014).

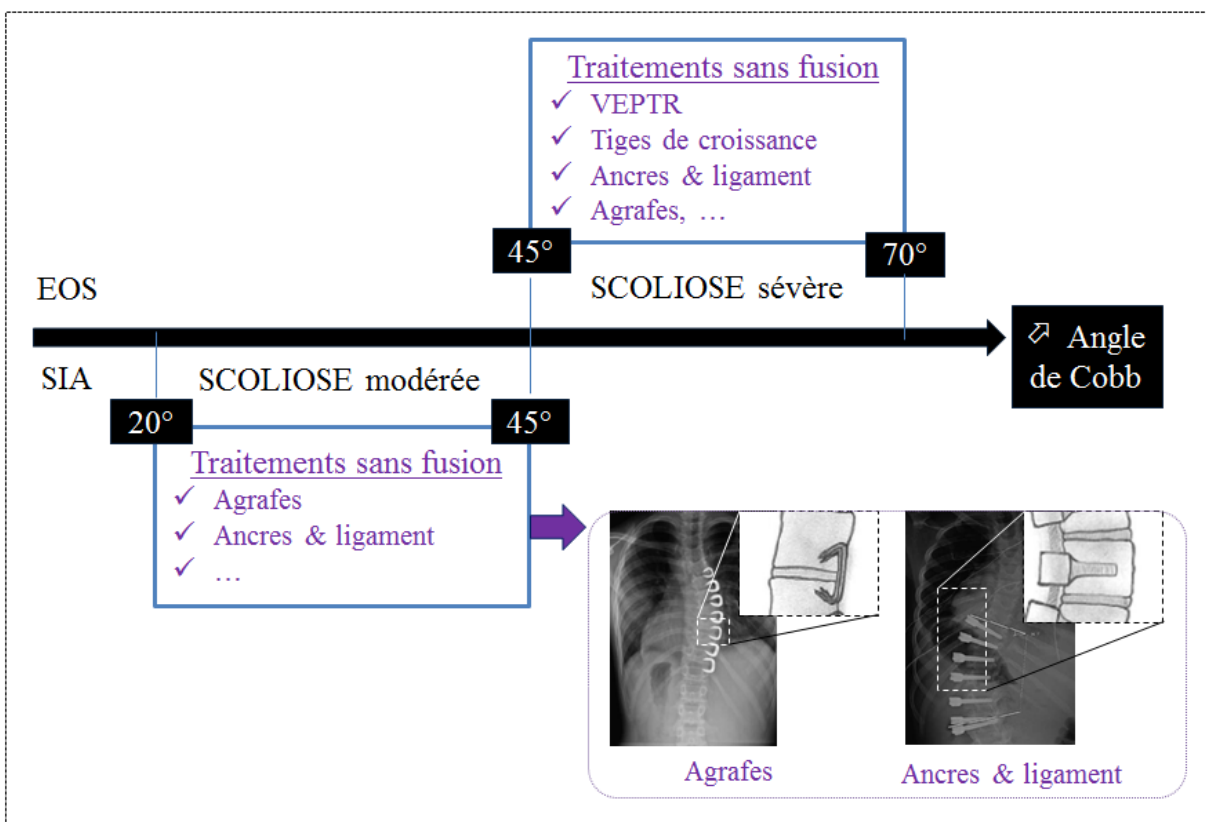


Figure 1.18: Traitements sans fusion pour les patients avec EOS et SIA en fonction de l'angle de Cobb (adapté de (Hunt, et al. 2010) et (Skaggs, et al. 2013))

1.3.5.5 Effets des implants sans fusion sur le disque : études animales *in vivo*

a. Agrafes versus vis et ligaments

Hunt et coll. ont comparé deux types d'implants sans fusion *in vivo* sur des chèvres pendant 6 mois par une approche inverse : agrafes à mémoire de forme, et vis et ligaments (Hunt, et al. 2010). Les changements les plus notables concernent la densité cellulaire et l'apoptose plus élevées des colonnes instrumentées. De plus, une augmentation de l'épaisseur de la PC et une réduction de la densité des canaux vasculaires de la PC ont été notées sur les niveaux instrumentés. Bien que la courbure fût plus prononcée avec la configuration en ligament par rapport aux agrafes, les modifications cellulaires et histologiques ont été plus importantes pour les agrafes. Aucune modification de PG ni de contenu en eau du disque n'a été observée. Cependant, sur les niveaux adjacents, la vascularité de la PC, la densité cellulaire et la composition de la matrice étaient préservées (Hunt, et al. 2010).

b. Ligament flexible

Newton et coll. ont investigué *in vivo* l'effet d'un ligament flexible avec un modèle porcin immature après 6 et 12 mois par une approche inverse (Newton, et al. 2008). La flexibilité du ligament le rapprocherait d'un chargement de type dynamique (Newton, et al. 2008). Aucun signe de dégénérescence discale n'a été obtenu. Les effets à long terme de ces ligaments sur la santé du disque doivent être étudiés (Newton, et al. 2008).

1.3.6 Rattrapage de croissance

1.3.6.1 Définition

Le phénomène de rattrapage de croissance survient suite à une période temporaire d'inhibition de croissance par des modifications externes réversibles (Lui, et al. 2011). Le rattrapage de croissance est alors défini par des taux de croissance qui excèdent les valeurs normales par rapport à l'âge et la maturité, une fois que les causes sont enlevées (Boersma and Wit 1997). Le rattrapage de croissance diffère de la croissance compensatoire qui a lieu suite à une perte de fonctionnalité définitive d'au moins une partie de tissu (Boersma and Wit 1997). Le rattrapage de croissance a été observé chez l'homme dans les cas de malnutrition, de déficience d'hormones de croissance, d'hypothyroïdisme ou encore d'excès de glucocorticoïdes (Emons, et al. 2005; Lui, et al. 2011). Des études *in vivo* chez le rat et le lapin respectivement dans des conditions d'hypothyroïdie (Marino, et al. 2008) et d'excès de glucocorticoïdes (Gafni 2001) ont montré que le rattrapage de croissance est dû au ralentissement de prolifération des chondrocytes de la PC conduisant au retard de la sénescence de la PC (Gafni 2001; Lui, et al. 2011; Marino, et al. 2008). Dans ces études, la PC demeure intègre, c'est-à-dire qu'elle ne subit aucun dommage structurel et fonctionnel.

1.3.6.2 Hypothèse

L'hypothèse sous-jacente expliquant le retard de sénescence énonce que les chondrocytes de la PC auraient un nombre limité et prédéterminé de divisions cellulaires, indépendamment de l'horloge biologique (Lui, et al. 2011). La présence d'un compteur de cycles cellulaires dans les chondrocytes de la PC contrôlerait la sénescence de la PC et donc la fin de la croissance (Lui, et al. 2011).

1.4 Mécanobiologie de la plaque de croissance et du disque intervertébral : études *in vivo*

1.4.1 Effets des chargements mécaniques en compression sur la plaque de croissance

1.4.1.1 Taux de croissance

De nombreuses études mécanobiologiques ont montré que l'intensité (niveaux de contrainte) (Ohashi, et al. 2002; Robling, et al. 2001; Stokes, et al. 2006; Stokes, et al. 2007), le type (statique, dynamique) (Robling, et al. 2001; Valteau, et al. 2011) et la durée du chargement (temps plein, temps partiel) (Stokes, et al. 2005a) constituent des facteurs importants influençant le taux de croissance. Ces trois facteurs sont présentés ci-dessous.

Intensité

Le niveau de contrainte permet de moduler la croissance selon le principe de Hueter-Volkmann, ce qui a été montré par plusieurs études. En effet, à type et durée de compressions égales, pour un chargement statique, Robling et coll. ont obtenu une réduction de la longueur des ulna des rats doublée de 2 à 4% lorsque la force appliquée était deux fois plus grande de 8.5 à 17N respectivement (Robling, et al. 2001). Ohashi a obtenu des conclusions similaires avec le même modèle d'ulna de rat chargés 10 min/jour, avec une compression dynamique avec une fréquence de 2 Hz et des valeurs maximales allant jusqu'à 4 et 8.5N (Ohashi, et al. 2002). Cependant, pour le troisième groupe dynamique à 17N, ils ont observé un arrêt de croissance (Ohashi, et al. 2002). À partir d'expériences systématiques *in vivo* sur des tibias et vertèbres de rats, veaux et lapins, Stokes et coll. ont établi une courbe de sensibilité du taux de croissance au chargement appliqué sur le tissu étudié (Stokes, et al. 2006). Les travaux de Stokes et coll. ont montré qu'une compression statique de 0.1 MPa est associée à une réduction de croissance variant entre 15% (vertèbre) et 18.6% (tibia) pour le rat par exemple (Stokes, et al. 2006). Ces résultats dépendent surtout de la localisation anatomique (tibia *versus* vertèbre) et non de l'espèce étudiée ni de l'âge de l'animal. De ces résultats, il établit une relation linéaire de croissance. En prenant une pente moyenne de 17.1% pour l'ensemble des animaux et localisations anatomiques étudiées, on peut en déduire que la contrainte maximale menant à un arrêt de croissance se situe autour de 0.6 MPa (Stokes, et al. 2006).

a. Type de compression : statique versus dynamique

Les études comparant chargement statique versus dynamique ont obtenu des modulations de croissance égales. Robling et coll. avaient deux groupes statique et dynamique (2.0 Hz) de force maximale équivalente. La longueur des ulnae mesurée post-mortem était réduite de 4% dans les deux groupes (Robling, et al. 2001). Avec un modèle de queue de rat, Valteau et coll. ont comparé des compressions équivalentes en termes de contrainte moyenne (0.2 MPa) pour des chargements statique et dynamique avec une fréquence de 0.1 Hz et une amplitude de 30 % (contrainte variant entre 0.14 et 0.26 MPa). La réduction du taux de croissance était semblable dans les deux groupes de 19.3% et 19.6% respectivement pour les groupes statique et dynamique, comparé au sham (Valteau, et al. 2011).

b. Durée

Stokes et coll. ont investigué l'effet de la compression à temps partiel de jour (12h/jour) et de nuit (12h/jour) *versus* temps plein (24h/jour) sur les vertèbres caudales et tibias de rats. Les résultats obtenus ont montré que le groupe chargé à temps plein a une réduction plus importante de croissance par rapport aux groupes à temps partiel que ce soit de jour ou de nuit (Stokes, et al. 2005a).

1.4.1.2 Paramètres histomorphométriques

Les paramètres histomorphométriques décrivent la structure de la PC et de ses différentes zones et constituants. Ces derniers incluent donc des mesures de hauteur de zones (Stokes, et al. 2007; Valteau, et al. 2011) et/ou de PC totale (Cancel, et al. 2008), des densités ou nombres de chondrocytes dans la zone proliférative (Stokes, et al. 2005a; Valteau, et al. 2011) ainsi que des tailles et volumes de chondrocytes hypertrophiques (Farnum, et al. 2000; Stokes, et al. 2007; Stokes, et al. 2005a; Valteau, et al. 2011). Les études *in vivo* ont montré que les paramètres histomorphométriques étaient sensibles à l'intensité mais surtout au type de compression appliquée : statique ou dynamique.

a. Hauteur de la PC

Les études *in vivo* avec une compression normalisée et contrôlée convergent vers des conclusions similaires avec des réductions de l'épaisseur des PC de vertèbres caudales de rat lorsque comparées aux vertèbres adjacentes contrôles pour les chargements statiques d'environ 25% (Cancel, et al. 2008; Stokes, et al. 2005a; Stokes, et al. 2002). Cependant, les réductions

histomorphométriques sont deux fois plus importantes pour le groupe statique avec 20.4% de réduction, comparé à 10.9% pour le groupe dynamique (Valteau, et al. 2011). Par conséquent, la compression dynamique semble mieux préserver la structure de la PC (Valteau, et al. 2011).

b. Hauteurs des chondrocytes hypertrophiques

Pour une compression statique de 0.2 MPa, Stokes et coll. ont trouvé une réduction de 20% de la hauteur des chondrocytes hypertrophiques (Stokes, et al. 2007). Les réductions de hauteurs reportées par Valteau et coll. comparant une compression statique et dynamique donc respectivement de 24.5% et de 15.3% (Valteau, et al. 2011). La tendance indiquant que la compression dynamique respecte davantage l'intégrité biologique de la PC est à nouveau observée.

1.4.1.3 Chargement et minéralisation

a. Compression de faible intensité

Reich et coll. ont étudié les effets de chargements légers sur des jeunes poulets en croissance en leur faisant porter des sacs de sable sans chirurgie ni opération (Reich, et al. 2005). Ce chargement additionnel avait pour but de simuler les effets de l'obésité chez les enfants, du transport de charges lourdes, ou du sport. Une perte de poids a été observée mais elle était reliée à une diminution de l'apport alimentaire qui était contrôlé et mesuré entre les groupes (Reich, et al. 2005). Ils ont également observé une diminution de l'épaisseur de la PC, suite à l'application de chargement, ainsi qu'une augmentation de l'ossification (Reich, et al. 2005). Une augmentation d'ostéopontine a été observée de plus de 4 fois ce qui corrèle les résultats de minéralisation augmentée suite aux chargements, au niveau des chondrocytes hypertrophiques et des ostéoblastes. Ils ont aussi trouvé des niveaux plus élevés de MMP9 autour de vaisseaux sanguins, indiquant une augmentation de vascularisation (Reich, et al. 2005). Au niveau de la géométrie osseuse, la longueur et le diamètre des os longs (tibia et fémur) étaient réduits avec le chargement.

b. Compression d'intensité élevée

Les chargements trop importants conduisent à une minéralisation plus faible voire inexistante. De plus, une absence de minéralisation de la PC est corrélée avec une hauteur plus élevée de zone proliférative associée à une augmentation de la hauteur totale de la PC (Ohashi, et al. 2002). Il est intéressant de noter que défaut de minéralisation et augmentation de hauteur de PC sont corrélés

et observés en clinique chez les PC des patients rachitiques, bien que les causes de la déficience de minéralisation soient dues à la nutrition et non aux chargements mécaniques. En effet, ces patients ont une minéralisation plus faible par manque de vitamine D causant une déficience d'absorption du calcium (Anderson and Shapiro 2010).

1.4.1.4 Retrait du chargement

Pour de futures applications cliniques, il est primordial de comprendre l'effet du retrait de chargement sur la croissance (Figure 1.19).

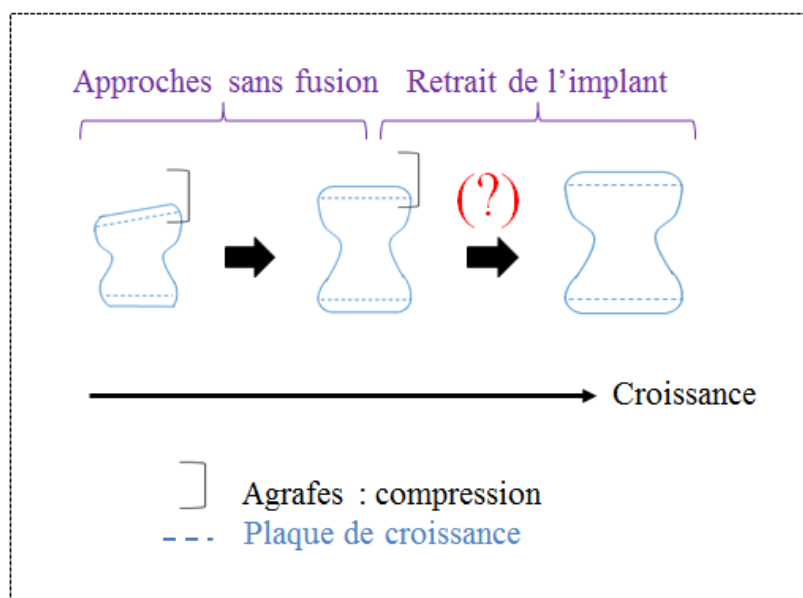


Figure 1.19: Incertitude de reprise de croissance après retrait de chargement et des implants sans fusion

Peu d'études *in vivo* ont étudié cette question et les réponses dépendent de l'intensité du chargement appliqué, qui apparaît à nouveau comme un paramètre critique à considérer.

a. Reprise de croissance avec compression physiologique uniquement

Ohashi et coll. ont investigué l'effet de l'application de trois niveaux de chargement dynamiques sur des ulna de rats à raison de 10 min/jour, pendant 8 jours suivi du retrait pendant 7 jours (Ohashi, et al. 2002). Ils ont observé une reprise de croissance chez les groupes chargés dynamiquement dans les groupes physiologiques. Par contre, pour le groupe de 17N, correspondant à un chargement bien au-delà des plages physiologiques, la plaque de croissance

présentait des dommages histologiques : présence de fissures, et la croissance n'a pas été poursuivie après retrait de chargement.

b. Croissance hyper-stimulée après retrait

Pour faire suite à leur première étude, Reich et coll. ont étudié l'effet de l'application et du retrait de chargement sur des jeunes poulets en croissance (Reich, et al. 2008). Ils ont observé une diminution de longueur de tibia suite au chargement, cependant après retrait de chargement, une longueur normale a été récupérée (Reich, et al. 2008). De façon intéressante, les auteurs ont observé une réduction de la hauteur de PC suite au chargement, mais après retrait de chargement, elle était augmentée de 127% par rapport aux contrôles. Ces résultats suggèrent un rattrapage de croissance après retrait de chargement. Également, les niveaux d'ostéopontine et de phosphatase alcaline sont augmentés suite au retrait du chargement en accord avec l'ossification accélérée et le processus de rattrapage (Reich, et al. 2008).

c. Conclusion sur les observations

Ces deux études montrent que des chargements modérés demeurant dans des plages physiologiques permettent une reprise de croissance, voire même plus importante que chez les contrôles. Et ces observations sont associées à une augmentation de la minéralisation.

1.4.2 Effets des chargements mécaniques en compression sur le disque intervertébral

La majorité des études sur le disque intervertébral investiguent l'effet des chargements mécaniques dans un contexte de dégénérescence discale sur des sujets adultes et matures. Similairement à la croissance, les modifications observées au niveau de la structure et de la composition du disque dépendent de la durée, du type et de l'amplitude du chargement appliqué.

1.4.2.1 Compression physiologique

Pour maintenir une position debout sans mouvement, les disques lombaires humains sont soumis à des forces de 500N (Hutton, et al. 1998). Par ailleurs, une valeur de contrainte de 1.3 MPa est équivalente à ce qui est appliqué sur les disques lombaires de l'homme pendant le lever d'un poids (Lotz, et al. 1998; Walsh and Lotz 2004).

1.4.2.2 Hauteur du disque et compression

De nombreuses études *in vivo* sur le disque intervertébral documentent une réduction de la hauteur du disque suite à des chargements en compression statique et dynamique et ce sur différents modèles animaux en variant les durées de 2h/jour pendant 72h (MacLean, et al. 2003; MacLean, et al. 2005) ou encore 6h/jour pendant 7 jours (Walsh and Lotz 2004) jusqu'à 1 an (Hutton, et al. 2000). Le tableau récapitulatif ci-dessous résume les principaux résultats obtenus sur des modèles animaux *in vivo* :

Tableau 1.1: Synthèse des études *in vivo* appliquant de la compression (statique et/ou dynamique) sur le disque intervertébral.

Référence	Animaux	Type de chargement	Configuration	Effets observés
Hutton et coll. (Hutton, et al. 1998)	✓ Chiens	✓ Durée : 27 semaines ✓ Statiques ✓ Physiologiques	✓ Deux disques lombaires L1/L2 et L3/L4 ✓ Deux disques contrôles adjacents (T13/L1 et L4/L5)	✓ Noyau : ↗ de force reliée à ↗ de collagène de type I et de ↘ de PG, CS et collagène de type II ✓ Pour ceux soumis à des forces plus grandes, dans l'anneau : pas de différence sur le collagène de type II, mais ↘ de PG, CS et collagène de type I

Référence	Animaux	Type de chargement	Configuration	Effets observés
Lotz et coll. (Lotz, et al. 1998)	✓ Souris	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 1 semaine de chargement, et un mois de retrait ✓ Statiques (x3) : 0.4, 0.8 et 1.3 MPa ✓ Retrait de chargement 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Un disque D₉₋₁₀ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Changements morphologiques dans tous les statiques, graduelle désorientation des fibres de l'anneau avec la contrainte, réversible pour 0.4 MPa mais pas pour 1.3 MPa. ✓ Fibrocartilage développé pour 1.3 MPa ✓ Collagène II et ARNm d'aggrécane dans tous les statiques ✓ Apoptose avec la magnitude
Iatridis et coll. (Iatridis, et al. 1999)	✓ Rats matures (4-5 mois)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 56 jours/8 semaines ✓ Immobilisation ✓ Statiques à 0.15 MPa ✓ 4 niveaux en % de la masse (BW), jusqu'à 4N pour 100%, considéré comme 'physiologique' 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Deux disques instrumentés D₈₋₉ et D₉₋₁₀ ✓ Deux disques contrôles D₁₀₋₁₁ et D₁₁₋₁₂ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pas ou peu d'effet sham ✓ Immobilisation cause de la hauteur discale, de la compliance axiale et la laxité angulaire. Statique cause des changements similaires mais plus rapidement et de façon plus marquée. ✓ Contenu en GAG et hydroxyproline chez les statiques, mais pas de changement pour le contenu en eau

Référence	Animaux	Type de chargement	Configuration	Effets observés
Hutton et coll. (Hutton, et al. 2000)	✓ Chiens adultes (sans PC)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 1 an ✓ Statique via des ressorts ✓ Physiologiques maximum de 0.6 MPa 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Disque lombaire L3/L4 ✓ Deux disques contrôles adjacents inter-animaux 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pas d'effet sur les disques contrôles ✓ Pas de changements morphologiques dégénératifs (fissures anneau, perte de hauteur, protubérance discale) ✓ Au niveau structurel (Figure 1.20) ✓ Pas d'épaississement de la PC
MacLean et coll. (MacLean, et al. 2003)	✓ Rats matures (plus de 12 mois)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 72h ✓ Chargement dynamique de 2h/jour (1 MPa à 0.2 Hz), combiné ou non avec de l'immobilisation 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Un disque chargé D₈₉ et deux disques contrôles D₆₇ et D₁₀₋₁₁ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Gènes de collagènes I et II ↗ pour immobilisation ou compression dynamique ✓ Dans l'anneau, ↗ de collagénase et stromélysine pour les groupes immobilisés et en compression dynamique. ✓ ↗ de l'aggrécanase dans l'anneau pour le groupe immobilisé seulement, mais ↗ dans le noyau pour les groupes immobilisé et en compression

Référence	Animaux	Type de chargement	Configuration	Effets observés
Walsh et coll. (Walsh and Lotz 2004)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Souris ✓ Adultes : 12 semaines 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 6h/jour pendant 7 jours ✓ Statique ✓ Dynamique (x4) avec deux fréquences 0.1Hz et 0.01Hz, et deux amplitudes 0.9 MPa et 1.3 MPa 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Un disque chargé 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pas de changement structurel dans les fibres de l'anneau ✓ PG ↗ pour dynamique à 0.9MPa/0.01Hz (faible fréquence) et tous les groupes à 1.3 MPa y compris le statique ✓ Apoptose du noyau ↗ pour tous les groupes à 1.3 MPa ✓ Apoptose de l'anneau ↗ pour dynamique 0.01Hz/0.9MPa et statique
Ching et coll. (Ching, et al. 2004)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Rats ✓ Age : 3-4 mois (matures) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 1h/jour pendant 14 jours ✓ Statique ✓ Dynamiques : à 0.5 Hz, 1.5 Hz et 2.5 Hz ✓ Physiologiques : chargement modéré 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Un disque chargé D₆₇ ✓ Deux disques contrôles adjacents inter-animaux 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pas d'effet sham mais effets sur disques contrôles intra-animaux ✓ PG du noyau ↗ avec statique et dynamique à 1.5 et 2.5 Hz ✓ PG ↗ pour dynamique 0.5 Hz ✓ Pas de changement de densité de chondrocytes dans le NP

Référence	Animaux	Type de chargement	Configuration	Effets observés
MacLean et coll. (MacLean, et al. 2005)	✓ Rats matures (plus de 12 mois)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 72h ✓ Chargement dynamique (1.0 MPa et 1.0 Hz) à 0.5h/jour ou 4h/jour 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Un disque chargé D₈₉ et deux disques contrôles D₆₇ et D₁₀₋₁₁ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ARNm du collagène de types I et II et de MMP-3 et 13 ↗ dans l'anneau avec la durée de chargement ✓ Dans le noyau ↗ d'aggrécane, d'ADAMTS-4, MMP-3 et 13 après 2h de chargement. Retour à la normale des niveaux d'aggrécane et de MMP-13 avec 4h de chargement
Lai et coll. (Lai, et al. 2008)	✓ Rats matures (4-5 mois)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 2 semaines suivies de 3 semaines de retrait ✓ Statiques à deux niveaux de chargement (11 et 17N) et durées de 1h/jour ou en continu ✓ Retrait de chargement 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Un disque chargé D₈₋₉ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pas d'effet sham sur les disques adjacents ✓ Hauteur du disque ↗ et changements morphologiques dégénératifs dans les groupes chargés en continu, y compris après retrait ✓ Hauteur du disque ↗ pour les statiques de petite durée 1h/jour mais retourne à la normale suite au retrait, ainsi que des changements morphologiques favorables

Référence	Animaux	Type de chargement	Configuration	Effets observés
Stokes et coll. (Stokes, et al. 2013)	✓ Rats immatures (5 semaines)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Durée : 2 groupes avec 5 jours et 5 semaines ✓ 4 groupes traités : angulation 15°, angulation et compression (0.1 MPa), compression à 0.1 MPa, et mobilité réduite 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Un disque D₇₋₈ ✓ Deux disques contrôles adjacents D₆₋₇ et D₈₋₉ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hauteur de disque ≈ pour les 4 groupes ✓ Pas de différence de contenu en eau et de cellularité ✓ GAG ↗ pour les groupes avec compression associé à ≈ taille de l'AH ✓ Aucun changement observé dans l'anneau

1.4.2.3 Composition du disque et compression

En vue du tableau de synthèse, le disque répond aux chargements en compression en adaptant sa structure et composition. Cependant, les résultats concernant le contenu en protéoglycanes du noyau suite à l'application de compression divergent.

a. Compression statique

Iatridis et coll. ont utilisé des faibles niveaux de forces et ont observé une augmentation du contenu en GAG du noyau (Iatridis, et al. 1999) sur des rats matures pendant 8 semaines. Cependant, également avec des forces physiologiques (non contrôlées ni quantifiées) sur du plus long terme avec des chiens, Hutton et coll. ont trouvé des changements structuraux (Figure 1.20) indiquant que le noyau devenait plus fibreux (Hutton, et al. 2000). Ces changements constituent des signes précurseurs de dégénérescence discale.

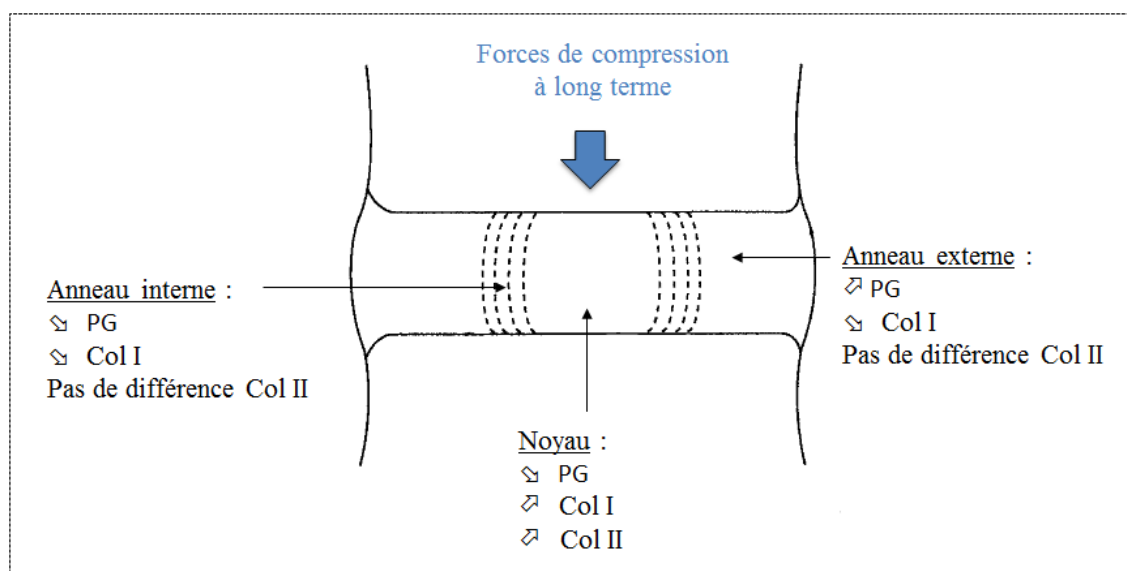


Figure 1.20: Effets de la compression à long terme sur la composition du disque intervertébral *in vivo* sur des chiens (adapté de (Hutton, et al. 2000))

b. Compression dynamique

Les deux études de Walsh et coll. et de Ching et coll. ont trouvé que les chargements dynamiques peuvent avoir des effets différentiels sur le disque intervertébral, et ce, en fonction de la fréquence et de l'amplitude de chargement. Le contenu en PG est augmenté pour les plus basses

fréquences ou les amplitudes plus élevées (Walsh and Lotz 2004). Ces résultats montrent une tolérance des cellules au stress mécanique appliqué. Cependant, il semble exister des niveaux maximaux à ne pas dépasser.

1.4.2.4 Retrait de chargement

Seules deux études *in vivo* décrivent les effets de retrait de compression sur le disque intervertébral. La première étude de Lotz et coll. a rapporté une corrélation entre les niveaux de chargement en compression et l'apoptose des cellules au sein du disque intervertébral (Lotz, et al. 1998). Il semblerait qu'il y ait un seuil d'apoptose cellulaire à partir duquel il soit difficile de récupérer ou en encore que le remodelage soit possible (Lotz, et al. 1998). Si le noyau n'est plus capable de reprendre la compression, il se dépressurise et force l'anneau à assurer cette fonction, d'où les transformations de cellules en chondrocytes dans le noyau et en fibrocartilage dans l'anneau. La seconde étude de Lai et coll. a observé une hauteur discale récupérée pour des niveaux physiologiques de chargement. Par contre, aucune récupération n'a été obtenue pour le groupe le plus élevé de 17N même après trois semaines de retrait de compression (Lai, et al. 2008).

1.4.3 Limitations liées à l'utilisation du modèle du rat

1.4.3.1 Plaque de croissance

La plaque de croissance joue un rôle dans l'apport nutritif du disque intervertébral, ainsi que mécaniquement par sa semi-perméabilité et ses propriétés mécaniques distinctes. La majorité de ces études ont été réalisées sur des animaux matures. Dans le cas des souris et des rats, ils conservent leur PC à l'âge adulte (Lotz, et al. 1998), mais elles ne sont plus actives. Par contre, chez le chien similairement à l'homme, les PC sont complètement refermées donc inexistantes à l'âge adulte (Hutton, et al. 2000).

1.4.3.2 Disque intervertébral

Les modèles animaux (souris, rat, chien) utilisés pour ces études contiennent tous une grande proportion de cellules notochordales dans le noyau des disques. Cette proportion est plus élevée que celle des humains (Hutton, et al. 2000). Or, les cellules notochordales ont un métabolisme plus élevé donc une meilleure capacité de régénération et d'adaptation, ce qui permettrait d'éviter la dégénérescence discale dans le modèle animal (Stokes, et al. 2013). Par conséquent, le modèle

est plus conservateur de ce qui serait réellement observé chez l'homme. De plus, le disque intervertébral du rat a des dimensions très inférieures à celles des disques humains mais son comportement biomécanique et sa réponse à la compression sont semblables aux disques lombaires humains après normalisation de la géométrie avec certaines différences (MacLean, et al. 2005).

1.4.3.3 Protocole : asymétrie involontaire et création de scoliose

A cause de l'implantation d'un appareil externe, il est possible de créer involontairement une scoliose si l'appareil n'est pas parfaitement aligné au départ. Cependant, il s'agit d'une limitation qui demeure mineure et qui est observée uniquement pour certains animaux en fonction de leurs mouvements dans leur environnement d'hébergement par exemple (Walsh and Lotz 2004).

CHAPITRE 2 : RATIONNELLE DE PROJET, QUESTIONS DE RECHERCHE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

2.1 Rationnelle du projet

La revue de littérature du chapitre précédent permet d'identifier les points clés suivants directement reliés au projet de recherche :

- ✓ La croissance longitudinale des os longs et des vertèbres s'effectue au niveau des plaques de croissance, tissus cartilagineux comportant trois zones (réserve, proliférative, hypertrophique) avec des compositions et arrangements cellulaires distincts;
- ✓ D'après la loi de Hueter-Volkman ainsi que des études *in vivo*, une augmentation de compression ralentit la croissance et, inversement, une réduction de compression l'accélère : il s'agit du principe de modulation de croissance;
- ✓ Basés sur ce principe, de nouveaux traitements sans fusion ont été développés afin de corriger les déformations musculosquelettiques progressives, dont la scoliose qui est une déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale, chez les enfants et adolescents avec un potentiel de croissance actif;
- ✓ Plus spécifiquement, pour les patients avec des scolioses précoces ou des courbures modérées de scoliose idiopathique de l'adolescent, des traitements sans fusion permettent d'appliquer une compression du côté convexe de la courbure pour ralentir la croissance de ce côté et ainsi rectifier les déformations au fil de la croissance;
- ✓ Le type de compression (statique *versus* dynamique) et ses paramètres (niveau de charge, contrainte/déformation, durée) ont une influence directe sur la croissance longitudinale des os et sur les paramètres histomorphométriques de la plaque de croissance, dont la hauteur totale et le volume des chondrocytes en particulier dans la zone hypertrophique;
- ✓ **Des combinaisons de compressions dynamiques cycliques, utilisant différentes fréquences et amplitudes et équivalentes en termes de contrainte moyenne, n'ont pas été testées et comparées sur un modèle animal *in vivo* afin de déterminer l'effet de ces paramètres sur le taux de croissance et l'histomorphométrie de la plaque de croissance;**

- ✓ Une fois les corrections des déformations obtenues, en fonction de l'âge des patients et de la durée du traitement, les patients peuvent avoir un potentiel de croissance résiduel. Il serait pertinent de vérifier si la plaque de croissance demeure fonctionnelle suite à un retrait de compression ;
- ✓ **La reprise de croissance suite au retrait d'une compression effectuant une modulation de croissance contrôlée n'a pas été vérifiée sur un modèle animal *in vivo* ;**
- ✓ L'initiation de la minéralisation de la PC est contrôlée par les chondrocytes hypertrophiques et elle est affectée suite à une compression statique. **Cependant, l'effet de la compression dynamique et sa comparaison avec un homologue statique en termes de contrainte moyenne sur la minéralisation n'ont pas été documentés;**
- ✓ Les segments et unités mobiles du rachis sont composés de vertèbres reliées par des disques intervertébraux assurant flexibilité, mouvement du rachis et transfert de charges;
- ✓ Le disque intervertébral comprend un noyau pulpeux en son centre, entouré d'un anneau fibreux. Le noyau est riche en protéoglycanes, dont l'aggrécane est le plus abondant, lui confère sa capacité à résister aux forces en compression;
- ✓ Avec l'âge, certaines pathologies ou encore des chargements mécaniques supra-physiologiques, une dégénérescence discale peut apparaître et se manifeste en premier lieu dans le noyau. Cliniquement, les signes précoces de dégénérescence discale sont une perte de hauteur discale, accompagnée de modifications structurelles au sein du noyau telles qu'une diminution de protéoglycanes, ce qui altère ses fonctions biomécaniques;
- ✓ Les implants sans fusion utilisés en clinique sont ancrés dans deux vertèbres adjacentes, entourant les disques intervertébraux au centre. Les chargements en compression des implants sont donc appliqués puis transférés via les disques, s'ajoutant aux chargements physiologiques quotidiens;
- ✓ L'effet des chargements en compression sur l'intégrité du disque dépend de la charge et la durée de la compression;
- ✓ **Il s'avère d'intérêt scientifique d'investiguer la santé du disque intervertébral soumis à de la compression permettant une modulation de croissance contrôlée, *in vivo* sur un modèle animal.**

2.2 Questions de recherche

L'analyse des éléments résumés ci-dessus a conduit à la formulation des trois questions de recherche suivantes :

Q1 : Quels sont les effets des paramètres dynamiques (fréquence, amplitude) d'une compression dynamique, de contrainte moyenne équivalente, sur le taux de croissance osseuse et sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance ?

Q2 : Quels sont les effets de l'application suivie du retrait subséquent d'une compression statique vs. dynamique, de contrainte moyenne équivalente, sur le taux de croissance, l'histomorphétrie de la plaque de croissance et sur la minéralisation osseuse?

Q3 : Quels sont les effets de l'application suivie du retrait subséquent d'une compression statique vs. dynamique, de contrainte moyenne équivalente, sur la structure et la composition du disque intervertébral ?

2.3 Objectifs spécifiques

Afin de tester les hypothèses énoncées précédemment, les objectifs spécifiques suivants ont été définis :

Objectif spécifique 1 (OS1) : Investiguer différentes combinaisons de chargement dynamique à savoir la fréquence (0.1 Hz, 1.0 Hz) et l'amplitude (30%, 100%).

Cet objectif a été subdivisé en plusieurs parties :

- ✓ Étape 1 : Adapter le système de chargement pneumatique (inspiré de (Walsh and Lotz 2004) et développé par (Valteau, et al. 2011) dans notre laboratoire) pour transmettre des chargements dynamiques à différentes fréquences et amplitudes et l'utiliser *in vivo* sur le rat.
- ✓ Étape 2 : Quantifier et comparer le taux de croissance et l'histomorphométrie des plaques de croissance.

La première étape consistait à réaliser les calibrations des appareils de façon reproductible sur le système pour qu'il fournisse les plages de fréquence et d'amplitude souhaitées. Ensuite, une fois le protocole approuvé par le comité d'éthique, les chirurgies ont été effectuées sur les animaux hébergés pendant les 15 jours de chargement avant euthanasie. La seconde étape a permis

d'obtenir les résultats numériques de taux de croissance (cf. Annexe A) et d'histomorphométrie de la plaque de croissance à partir des coupes de vertèbres enrobées dans du méthacrylate de méthyle.

Objectif spécifique 2 (OS2) : Investiguer l'effet du retrait du chargement sur la fonctionnalité et l'intégrité de la PC en suivant la démarche détaillé ci-dessous :

- ✓ Étape 1 : Concevoir un nouvel appareil permettant l'application et le retrait de chargements statique et dynamique en fonction du matériel disponible.
- ✓ Étape 2 : Adapter le protocole de l'objectif spécifique 1 et réaliser les expériences *in vivo*.
- ✓ Étape 3 : Développer une méthode pour quantifier la minéralisation à partir de vertèbres enrobées dans du méthacrylate de méthyle.
- ✓ Étape 4 : Quantifier et comparer le taux de croissance, l'histomorphométrie et la minéralisation de la plaque de croissance.

La première étape comprenait la conception d'un appareil de chargement, basé sur le même principe d'air comprimé pour transmettre les compressions statique et dynamique. L'appareil a été adapté aux dimensions et à la forme de nouveaux ballons (transmettant la pression) et d'animaux plus grands pour prendre en compte la croissance pendant le retrait de chargement. La seconde étape portait sur les modifications de protocole pour inclure l'ensemble des analyses souhaitées et paramètres à analyser, à savoir 10 jours supplémentaires de retrait de chargement, des scans *ex-vivo* au microCT ainsi que des coupes de tissus enrobés dans le méthacrylate de méthyle contenant simultanément vertèbres et disques intervertébraux (cf. Annexe A). La troisième étape consistait à mettre au point une coloration de lames permettant de visualiser la minéralisation de la plaque de croissance. Enfin, la quatrième étape a conduit à l'obtention des résultats attendus.

Objectif spécifique 3 (OS3) : Investiguer l'effet du retrait du chargement sur la fonctionnalité et l'intégrité du disque intervertébral avec les étapes suivantes :

- ✓ Étape 1 : Choisir et développer les méthodes d'analyse quantitative des paramètres géométriques et structurels du disque intervertébral.
- ✓ Étape 2 : Quantifier et comparer les structures du disque intervertébral (hauteur, proportion noyau/anneau) et les contenus en protéoglycanes du noyau.

La première étape consistait à choisir les paramètres d'intérêt à évaluer sur le disque intervertébral à partir des techniques à disposition ou qui pouvaient être développées. Ainsi, les hauteurs du disque ont été mesurées sur les échantillons *ex-vivo* des vertèbres adjacentes imagées au microCT (cf. Annexe A). La proportion noyau/anneau a été obtenue à l'aide de méthodes stéréologiques (cf. Annexe A) à partir des coupes de tissus enrobés dans du méthacrylate de méthyle. Le contenu en protéoglycanes du noyau a été analysé sur les coupes colorées à la Safranine-O, en utilisant ImageJ, comme le ratio du nombre de pixels colorés divisé par le nombre total de pixels du noyau. La seconde étape concernait la réalisation de la quantification et les analyses statistiques afin de comparer les paramètres mesurés pour chaque groupe d'animaux.

Méthodologie adoptée

Les résultats présentés dans cette thèse par articles sont réparties en deux séries d'expériences :

- ✓ une première série qui répond à la question de recherche 1 selon la méthodologie de l'objectif spécifique 1 (Chapitre 3);
- ✓ une seconde série qui répond aux questions de recherche 2 et 3 avec les méthodes décrites dans les objectifs spécifiques 2 et 3 respectivement (Chapitres 4 et 5).

L'ensemble des résultats et des analyses est résumé dans la représentation graphique ci-dessous (Figure 2.1) complétée par le tableau (Tableau 2.1) détaillant les paramètres analysés à partir des tissus récoltés :


		ÉTUDES <i>IN VIVO</i> CHEZ LE RAT		
Rationnelle	Question	Q1	Q2	Q3
	Objectif	OS1	OS2	OS3
Conditions expérimentales	Compression	✓	✓	✓
	Retrait de compression	✗	✓	✓
Analyses	Croissance	✓	✓	✗
	Disque	✗	✗	✓
		Chapitre 3	Chapitre 4	Chapitre 5

Figure 2.1: Représentation graphique du projet

Tableau 2.1: Présentation globale des analyses et paramètres évalués dans les trois prochains chapitres

Chapitres	Traitements appliqués	Analyses	Tissus récoltés	Paramètres évalués
Chapitre 3 – Première série expérimentale	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Une série avec chargement de 2 semaines ✓ Cinq groupes de rats : contrôle, sham, dynamique amplitude (100%), dynamique fréquence (1.0 Hz), dynamique amplitude (100%) et fréquence (1.0 Hz) 	Plaques de croissance (PC)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vertèbres contrôles : 5^{ème} et 9^{ème} vertèbres caudales (Cd5, Cd9) ✓ Vertèbre chargée : 7^{ème} vertèbre caudale (Cd7) 	<p>Fonctionnalité :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Taux de croissance <hr/> <p>Histomorphométrie :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hauteur PC ✓ Hauteur cellule ZH ✓ Densité cellulaire ZP
Chapitre 4 – Seconde série expérimentale	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Deux groupes : 2 semaines et 4 semaines ✓ Quatre sous-groupes de rats par groupe : contrôle, sham, statique, dynamique 	Plaques de croissance (PC) & moelles épinières	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Moelles épinières ✓ Vertèbre contrôle Cd5 ✓ Vertèbre chargée Cd7 	<p>Fonctionnalité de la PC :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Taux de croissance <hr/> <p>Histomorphométrie de la PC :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hauteur PC ✓ Hauteur cellule ZH <hr/> <p>Calcification de la PC :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Intensité de calcium <hr/> <p>Douleur neuropathique :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Concentrations en substance P et en peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP)

Chapitres	Traitements appliqués	Analyses	Tissus récoltés	Paramètres évalués
Chapitre 5 – Seconde série expérimentale	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Deux groupes : 2 semaines et 4 semaines ✓ Quatre sous-groupes de rats par groupe : contrôle, sham, statique, dynamique 	Disque intervertébral	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Disque contrôle entre les 4^{ème} et 5^{ème} vertèbres caudales : D₄₅ ✓ Disque chargé entre les 7^{ème} et 8^{ème} vertèbres caudales : D₇₈ 	Structure : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hauteur du disque <hr/> Composition : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Proportion noyau/anneau ✓ Contenu en protéoglycanes du noyau

CHAPITRE 3 : ARTICLE 1 : IN VIVO DYNAMIC LOADING REDUCES BONE GROWTH WITHOUT HISTOMORPHOMETRIC CHANGES OF THE GROWTH PLATE

Ce chapitre présente le premier article rédigé dans le cadre de cette thèse et répondant à l'objectif spécifique 1 détaillé dans le Chapitre 2.

Cet article a été publié dans *Journal of Orthopaedic Research* © 2014 Orthopaedic Research Society le 13 mai 2014.

La contribution du premier auteur à la revue de littérature, la réalisation du protocole, l'obtention des résultats et l'écriture est estimée à 85%.

Description détaillée de la contribution de chacun des auteurs :

Anne-Laure Ménard : conception, réalisation du protocole expérimental, analyse et interprétation des résultats, rédaction et formatage de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

Guy Grimard : chirurgie sur les animaux, interprétation des résultats, révision de l'article

Barthélémy Valteau : formation, méthodologie et techniques expérimentales, révision de l'article

Irène Londono : formation et méthodologie expérimentale, interprétation des résultats, révision de l'article

Florina Moldovan : conception, interprétation des résultats, révision de l'article

Isabelle Villemure : conception, interprétation des résultats, révision et corrections de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

3.1 Abstract

Purpose: This *in vivo* study aimed at investigating the effects of dynamic compression on growth plate.

Methods: Rats (28 days old) were divided into three dynamically loaded groups, compared with two groups (control, sham). A device was implanted on the 6th and 8th caudal vertebrae for 15 days. Controls (n=4) did not undergo surgery. Shams (n=4) were operated but not loaded. Dynamic groups had sinusoidal compression with a mean value of 0.2 MPa: 1.0 Hz and \pm 0.06 MPa (group a, n=4); 0.1 Hz and \pm 0.2 MPa (group b, n=4); 1.0 Hz and \pm 0.14 MPa (group c, n=3).

Results: Growth rates ($\mu\text{m/day}$) of dynamic groups (a) and (b) were lower than shams ($p < 0.01$). Growth plate heights, hypertrophic cell heights and proliferative cell counts per column did not change in dynamic (a) and (b) groups compared with shams ($p > 0.01$). Rats from dynamic group (c) had repeated inflammations damaging tissues; consequently, their analysis was unachievable.

Conclusion: Increasing magnitude or frequency leads to growth reduction without histomorphometric changes. However, the combined augmentation of magnitude and frequency alter drastically growth plate integrity. Appropriate loading parameters could be leveraged for developing novel growth modulation implants to treat skeletal deformities.

3.2 Keywords

Growth plate; Mechanical modulation; *In vivo* dynamic compression; Histomorphometry; Rat caudal vertebra.

3.3 Introduction

Mechanical loading is involved in normal bone growth and development (Stokes 2002; Stokes, et al. 2002). Loadings beyond physiological ranges or asymmetrically distributed loadings promote the progression of skeletal deformities (Aronsson, et al. 1999; Stokes 2002), such as adolescent idiopathic scoliosis (Mente, et al. 1999), Scheuermann's kyphosis (Stokes 2002) or Blount's disease (Bries, et al. 2012). Some of these progressive musculoskeletal pathologies worsen during periods of rapid growth, such as adolescence (Lowe, et al. 2000).

Mechanical loading modulates bone growth rate (Alberty, et al. 1993) according to the Hueter-Volkmann law. This law states that increased compression reduces bone growth rate whereas reduced compression increases it (Cancel, et al. 2008; Mente, et al. 1999; Stokes 2002; Valteau, et al. 2011). Consequently, mechanical growth modulation could be used to correct or, at least, halt these deformities, if adequately timed mechanical loadings are applied on growing bones (Aronsson and Stokes 2011). New fusionless treatments are based on mechanical growth modulation for the correction of moderate adolescent idiopathic scoliosis (Betz, et al. 2010; Schmid, et al. 2008; Wall, et al. 2005). However, the design of such devices requires investigation in order to better understand the relationships between loading parameters and modulated bone growth.

Longitudinal bone growth occurs in the growth plates (Hunziker and Schenk 1989a; Hunziker, et al. 1987), which is divided into three zones: reserve, proliferative and hypertrophic (Ballock and O'Keefe 2003a; Cancel, et al. 2008), each with specific histomorphological characteristics (Hunziker, et al. 1987) and mechanical properties (Sergeie, et al. 2009). Three main factors contributing to bone growth are cellular enlargement in the hypertrophic zone (40-50%), matrix synthesis (35-45%) and cell duplication in the proliferative zone (10%) (Wilsman, et al. 1996b). Dynamic compression applied on growing bones showed controversial results in the literature (Akyuz, et al. 2006; Niehoff, et al. 2004; Ohashi, et al. 2002; Robling, et al. 2001). Valteau et al. were the first study to compare *in vivo* static *versus* dynamic compressions with similar time-averaged stresses (Valteau, et al. 2011) using a rat tail model. They found that both compressions induced similar bone growth rate reduction, but that dynamic compression was less damaging than static compression for the growth plate (Valteau, et al. 2011). Robling investigated different frequencies and magnitudes of the dynamic loading applied for 10 min per day in rats forelimbs, and found that growth was reduced proportionally to load magnitude and not the average load (Robling, et al. 2001). However, the loading conditions did not have similar time-averaged stresses.

The purpose of this study was to investigate the effects of dynamic compression parameters on bone growth rate and growth plate histomorphometry. We hypothesize that growth modulation is controlled by the average compressive stress. Moreover, among dynamic parameters, we suggest that frequency has more impact on growth compared to magnitude. Our study was designed to

test and compare three similar time-averaged stresses of dynamic compressions with different magnitudes and frequencies using an *in vivo* rat tail model.

3.4 Methods

3.4.1 Animal Model and Loading Conditions

With the approval of the Institutional Animal Care Committee, 19 male Sprague-Dawley rats were received at the age of 21 days old. After one-week of acclimatization, the protocol was conducted from 28 to 43 days old, corresponding to the rat pubertal growth spurt (Alvarez, et al. 2000; Hunziker and Schenk 1989a). Rats were divided into three dynamic groups (a, b, c) and further compared with control and sham groups (Table 1). Rats from the three dynamic groups were exposed to the sinusoidal loading with an average stress of 0.2 MPa at various magnitudes and frequencies. The stress variation was chosen at a mean value of 0.2 MPa as it represents a wide physiological stress interval that is still retarding but not arresting bone growth (stress value over 0.6 MPa) (Stokes, et al. 2006). The frequencies were either lower (0.1Hz) or close to an average walking frequency (1.0 Hz) for humans. The magnitude of one sinusoidal cycle was defined as the absolute value of the difference between an extremum (minimum or maximum) stress and the average stress (0.2 MPa), divided by the average stress. Magnitudes were expressed as a percentage of the mean compression. For example, $0.2 \text{ MPa} \pm 30\%$ corresponded to a stress range of [0.14 MPa; 0.26 MPa]. Three dynamic conditions were investigated: Dyn (a): 1.0 Hz and 30%, Dyn (b): 0.1 Hz and 100%, Dyn (c): 1.0 Hz and 70% (maximal magnitude supported by the apparatus at 1.0 Hz) (Figure 3.1, Table 3.1). Rats from the control group (n=4) did not receive any treatment. Shams (n=4) were operated but no compression was applied.

Table 3.1: Number of rats per group and loading parameters.

Group		Number of rats	Dynamic loading parameters	
			Magnitude [MPa]	Frequency [Hz]
Control		n = 4	N/A	N/A
Sham		n = 4	0	N/A
Dynamic	Dyn (a)	n = 4	$0.2 \pm 30\%$ [0.14 ; 0.26]	1.0
	Dyn (b)	n = 4	$0.2 \pm 100\%$ [0 ; 0.4]	0.1
	Dyn (c)	n = 3 ^a	$0.2 \pm 70\%$ [0.06 ; 0.34]	1.0

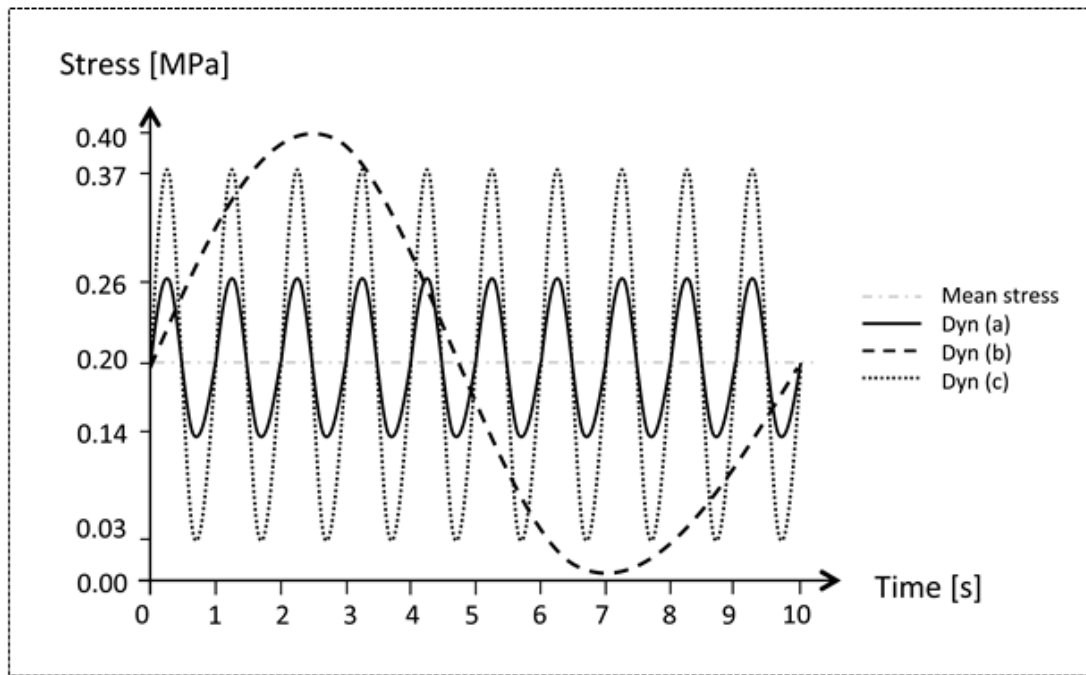


Figure 3.1: Loading conditions. The grey line represents the mean stress value of 0.2MPa.

Compression was applied on the 7th caudal vertebra (Cd7) and maintained for 15 days. To do so, the force was increased every day according to the calibration curves, to compensate for the growth of the transverse vertebral area, as previously described in Cancel et al. (Cancel, et al. 2008) and Valteau et al. (Valteau, et al. 2011).

3.4.2 Micro-loading Device System and Calibration

The micro-loading device consisted of two percutaneously implanted fixations on the 6th (Cd6) and 8th (Cd8) caudal vertebrae of the rat (Figure 3.2-A). Compressive loading was transmitted through the inflation/deflation of a latex bladder (California Medical Innovations, Pomona, CA, USA) similarly to a previous study (Valteau, et al. 2011). This pneumatic micro-loading device was calibrated using a micro-mechanical loading machine (MACH-1, Biomomentum, Laval, QC, Canada) to establish the force/voltage relationship (Figure 3.2-B).

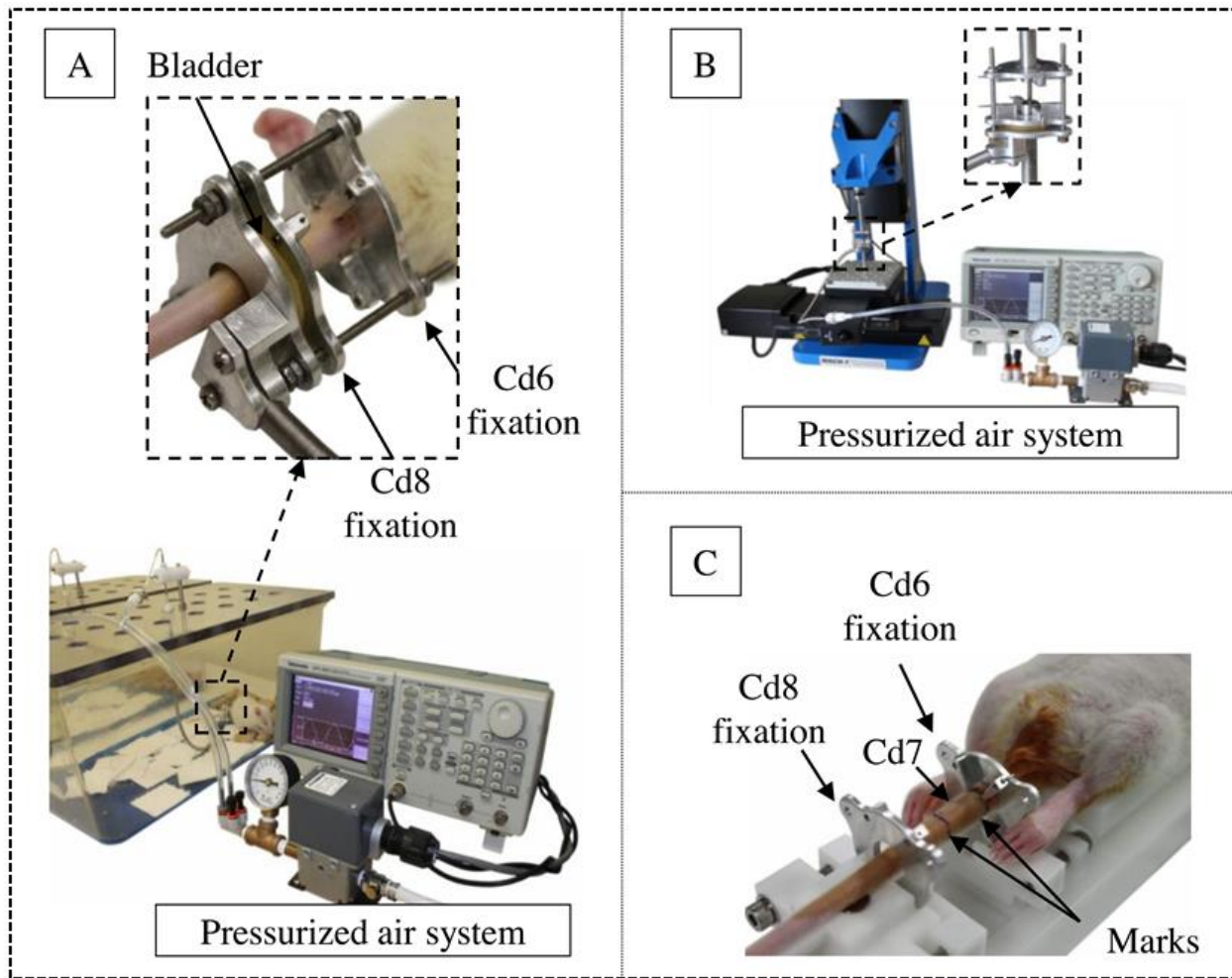


Figure 3.2: Micro-loading device. A: Air-compressed system installed on the rat tail. B: Calibration of the device on the micro-loading apparatus (MACH-1). C: Rat tail positioned on the surgical guide to ensure a perfect alignment of the tail at the center of Cd6 and Cd8 fixations.

3.4.3 Surgery and Experimental Procedure

Rats were anesthetized with isoflurane during surgery. They received subcutaneous injections of an analgesic (Buprenorphine, 50 $\mu\text{g/kg}$) and an antibiotic (Baytril, 5 mg/kg) to minimize pain and infection. After disinfection of their tail with alcohol and 10% povidone-iodine topical solution (Proviodyne), Cd6 and Cd8 were located using a fluoroscope (GE OEC 9900 Elite). Rats were then installed on a custom-designed surgical guide (Figure 3.2-C), ensuring that their tails were well centered in the fixations. Pins (Kirschner wires, 0.6 mm diameter, Medeco-ch, Prangins,

VD, Switzerland) were inserted through the tails (Figure 3.2-C). Positions of the fixations were confirmed by fluoroscopic imaging (Cancel, et al. 2008; Stokes, et al. 2005b; Valteau, et al. 2011). Long stainless steel screws, the bladder and its support were added to complete the installation of the micro-loading device. The procedure lasted 20 to 30 min, and the device was well tolerated by the rats, which recovered within 2h post-surgery.

3.4.4 Daily Adjustments and Calcein Injections

Loading started immediately following surgery. The loading device was adjusted daily at the same time of day for 10 min under isoflurane to compensate for longitudinal growth. Voltage values were changed according to calibration curves. Rats were given ad libitum standard animal food and were kept in an artificial twelve-hour light cycle. A fluorescent marker, calcein (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA; 15 mg/kg) was injected intraperitoneally for growth measurements (Cancel, et al. 2008; Hunziker and Schenk 1989a; Hunziker, et al. 1987; Stokes, et al. 2006; Stokes, et al. 2005b; Valteau, et al. 2011) at five and two days prior to euthanasia.

3.4.5 Tissue Collection and Processing

After CO₂ asphyxiation, three caudal vertebrae (one loaded Cd7; two unloaded (Cd5, Cd9) used as intra-animal controls) were removed and fixed in formalin solution (Anachemia, Montréal, QC, Canada) for 48h. They were dehydrated in alcohol solutions and clarified in xylene. After infiltration, they were embedded in methylmetacrylate (MMA) (Fisher Scientific Canada, Nepean, ON, Canada). Upon complete polymerization, Cd5, Cd7 and Cd9 blocks were cut with a microtome (Leica SM2500) in 6 µm sections. For each vertebra, 36 slides were examined. These tissue sections were cut along the longitudinal bone axis to cover 40-50% of the growth plate depth. 18 slides were stained with 0.2% toluidine blue and mounted for histomorphometric measurements. 18 slides were mounted away from light for growth rate measurements. Slices were observed under a microscope (Leica DMR with Retiga Qimaging Camera), using 5X magnification for growth rate measurements, 10X and 20X for histomorphometric measurements.

3.4.6 Growth Rate and Histomorphometric Parameters

Growth rate was calculated as the distance between the two calcein labels divided by the time interval (3 days) between the injections (Hunziker and Schenk 1989a). Measurements were

completed with a custom-made Matlab software, where both calcein lines were modeled as splines and the distance between the labels was automatically calculated as the mean value of 100 segments parallel to the longitudinal growth direction (Valteau, et al. 2011). Histomorphometric parameters included the total growth plate height, heights of the three zones, the hypertrophic cell height, and the number of proliferative cells per column. Hypertrophic cell height and the number of proliferative chondrocytes per column were used as indirect markers of bone growth, respectively of hypertrophy and proliferation (Cancel, et al. 2008; Stokes, et al. 2005b; Valteau, et al. 2011). Growth plate and zonal heights were evaluated on 10X-magnified images using a similar approach to calcein measurements, with mean values on 100 measured segments. The hypertrophic cell height along the longitudinal growth direction was evaluated as the mean of the 20 largest hypertrophic chondrocytes and measured on 20X images. The number of proliferative chondrocytes per column was evaluated on 20X-magnified images for five random columns per growth plate. For one caudal vertebra, final growth rate and histomorphometric parameters measurements were obtained by averaging twelve values, i.e. two measurements per microscope slide (one on the proximal and one on the distal growth plate) multiplied by six series.

3.4.7 Statistical Analyses

One-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures identified differences between the mean values of each parameter in each dynamic experimental group and separately for each vertebra (loaded Cd7, intra-animal controls Cd5 and Cd9). Post-hoc comparisons between groups were done with Tukey's tests. Results were provided with the mean values \pm standard deviations. Differences were considered significant for $p < 0.01$.

3.5 Results

3.5.1 Effect of the Surgical Procedure

The control group was used to evaluate the effect of the surgical procedure compared with shams. The growth rate of Cd7 in the control group was similar to shams and about 16 to 17% greater than loaded animals (i.e. animals with the apparatus installed). It was observed that the growth rate of control animals was about 6% greater at Cd5, and about 6% less at Cd9 than for sham and loaded animals, with several comparable magnitude trends in histomorphological measurements,

but none of these differences were statistically significant (Figures 3.3 and 3.5, Tables 3.2, 3.3 and 3.4).

Table 3.2: Parameters of the loaded vertebra Cd7 (mean value \pm SD) with $^*p < 0.01$ compared to shams and $^{ct}p < 0.01$ compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CNC: number of proliferative chondrocytes per column in the proliferative zone (PZ), CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ). (a) Inflammations occurred in all rats loaded with Dyn (c); surgeries had to be interrupted and no results could be obtained for this group.

Cd7 vertebra		GR [$\mu\text{m}/\text{day}$]	GPH [μm]	CNC (PZ) [cells]	CH (HZ) [μm]
Control (n = 4)		35.1 ± 1.8	201.9 ± 13.9	9.7 ± 0.3	30.7 ± 0.8
Sham (n = 4)		35.8 ± 2.5	171.9 ± 14.7	9.8 ± 0.7	27.0 ± 2.2
Dynamic	Dyn (a) (n = 4)	$29.4 \pm 0.9^{*ct}$	167.5 ± 7.0^{ct}	8.2 ± 0.9	26.3 ± 1.6^{ct}
	Dyn (b) (n = 4)	$29.2 \pm 0.3^{*ct}$	185.5 ± 8.3	8.4 ± 0.2^{ct}	27.2 ± 0.9^{ct}
	Dyn (c) (n = 3)	-	-	-	-

Note: No results could be obtained from Dyn(c)

Table 3.3: Parameters of the within-animal control vertebra Cd5 (mean value \pm SD) with $^*p < 0.01$ compared to shams and $^{ct}p < 0.01$ compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CNC: number of proliferative chondrocytes per column in the proliferative zone (PZ), CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).

Cd5 vertebra		GR [$\mu\text{m}/\text{day}$]	GPH [μm]	CNC (PZ) [cells]	CH (HZ) [μm]
Control (n = 4)		37.7 ± 1.0	198.1 ± 15.8	9.6 ± 0.5	29.1 ± 0.7
Sham (n = 4)		34.9 ± 1.7	171.4 ± 14.4	9.1 ± 0.7	26.7 ± 0.9
Dynamic	Dyn (a) (n = 4)	34.4 ± 2.2	176.8 ± 7.9	8.6 ± 0.2	27.6 ± 0.8
	Dyn (b) (n = 4)	34.5 ± 1.6	174.6 ± 10.6	8.7 ± 0.4	27.0 ± 1.7
	Dyn (c) (n = 3)	-	-	-	-

Table 3.4: Parameters of the within-animal control vertebra Cd9 (mean value \pm SD) with $^*p < 0.01$ compared to shams and $^{ct}p < 0.01$ compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CNC: number of proliferative chondrocytes per column in the proliferative zone (PZ), CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).

Cd9 vertebra		GR [$\mu\text{m}/\text{day}$]	GPH [μm]	CNC (PZ) [cells]	CH (HZ) [μm]
Control (n = 4)		35.0 ± 2.2	203.3 ± 7.6	9.7 ± 0.7	30.1 ± 2.5
Sham (n = 4)		36.0 ± 2.8	194.6 ± 8.2	9.6 ± 0.8	30.4 ± 1.4
Dynamic	Dyn (a) (n = 4)	38.0 ± 1.1	204.2 ± 6.4	10.4 ± 0.3	30.6 ± 2.4
	Dyn (b) (n = 4)	39.9 ± 2.3	205.6 ± 12.0	11.0 ± 0.4	30.9 ± 0.6
	Dyn (c) (n = 3)	-	-	-	-

3.5.2 Growth Rate (GR)

Similar growth rates (Figure 3.3, Table 3.2) were obtained in dynamic groups (a) and (b), and resulted in growth rate reductions of 22.4% and 23.0% respectively ($p < 0.01$) with respect to shams. The ultimate dynamic (c) condition, combining an increase in both maximum magnitude and frequency, was tested only on three animals since severe inflammation occurred. These three rats had to be euthanized before the end of the experiments. No results could subsequently be retrieved from Dyn (c) group.

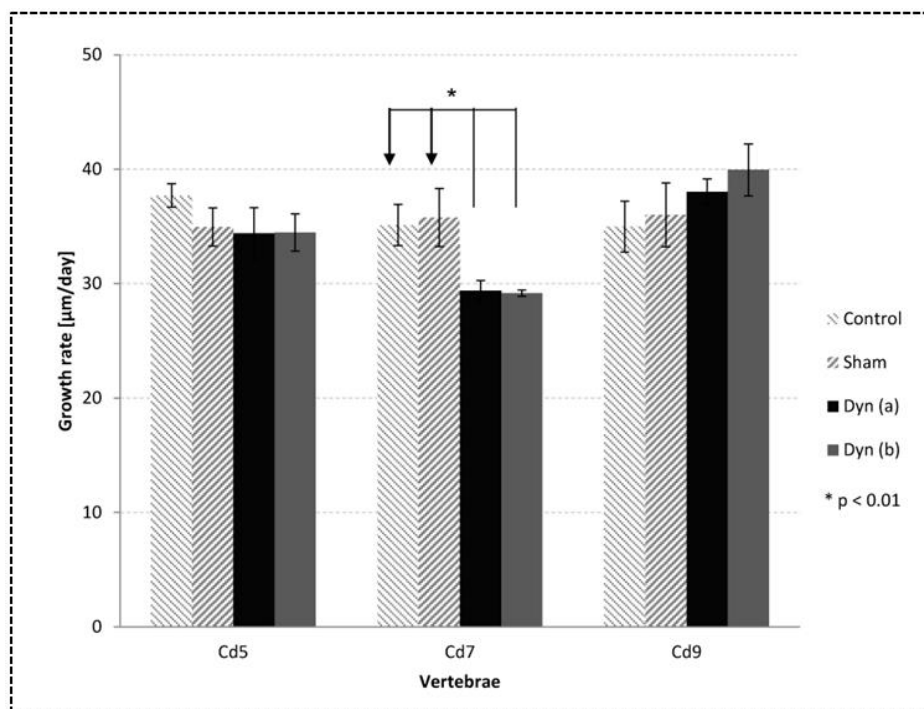


Figure 3.3: Growth rate measurements. The arrow indicates the reference group used in comparisons. The presented data are listed in the growth rate (GR) column of Tables 2, 3 and 4.

3.5.3 Histomorphometric Parameter: Total Growth Plate Height

No significant difference was found in the total growth plate height (Figure 3.4A through D) between dynamic (a) and (b) conditions when compared to shams (Figure 3.5-A, Table 3.2).

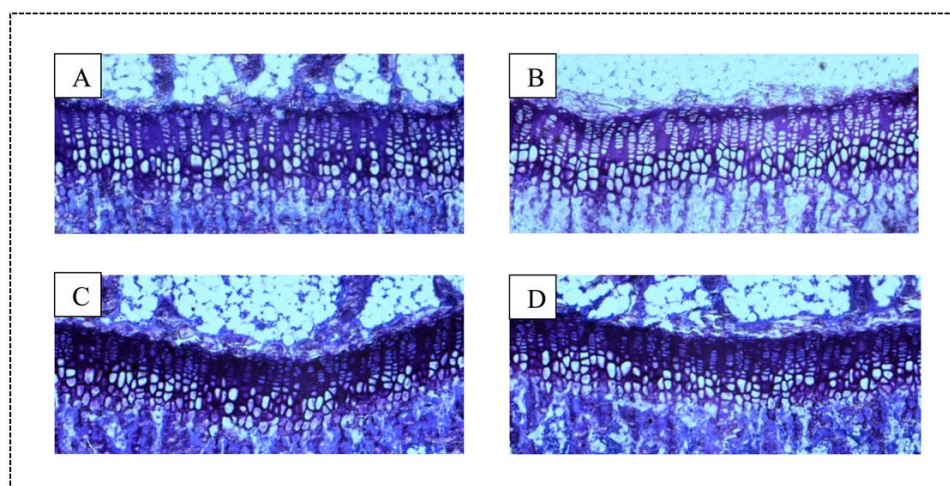


Figure 3.4: Optic microscope images of growth plates. A: Control group, B: Sham group, C: Dyn (a) (30%, 1.0Hz), D: Dyn (b) (100%, 0.1Hz). Toluidine blue, 10X.

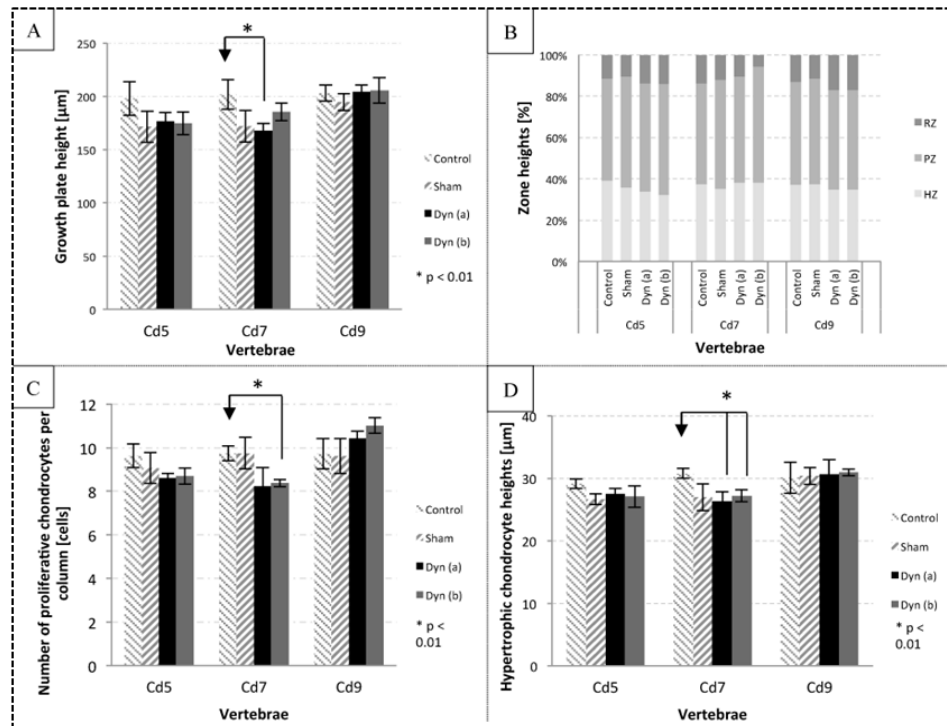


Figure 3.5: Histomorphometric results for the within-animal control vertebrae (Cd5 and Cd9) and the loaded vertebra (Cd7). The presented data are listed in the growth plate height (GPH), the number of proliferative cells per column (CNC) and the chondrocyte height (CH) columns of Tables 2, 3 and 4. Fig.5-A: Total growth plate height, Fig.5-B: Proportions of growth plate zone heights, Fig.5-C: Number of proliferative chondrocytes per column, Fig.5-D: Hypertrophic cell height.

3.5.4 Histomorphometric Parameter: Growth Plate Zone Heights

Overall, the proportion of the three growth plate zones (Figure 3.4-A through D), evaluated as percentages of the total growth plate height, remained similar in all groups ($p > 0.01$), with respective contributions of 52% for the proliferative zone (PZ), followed by 36% for the hypertrophic zone (HZ) and 12% for the reserve zone (RZ) (Figure 3.5-B).

3.5.5 Histomorphometric Parameter: Number of Proliferative Chondrocytes per Column (CNC)

An approximately 15% reduction of the number of proliferative chondrocytes per column (Figure 3.4-A through D) was observed in loaded vertebrae relative to shams and controls, but these differences were not statistically significant (Figure 3.5-C, Table 3.2).

3.5.6 Histomorphometric Parameter: Hypertrophic Cell Height (CH)

Hypertrophic cell heights (Figure 3.4-A through D) were similar for Dyn (a) and (b) conditions ($p > 0.01$) when compared to shams (Figure 3.5-D, Table 3.2).

3.5.7 Cd5 and Cd9 Intra-Animal Vertebrae Control

Growth rates of non-loaded vertebrae (Cd5 and Cd9) were similar in all groups ($p > 0.01$) (Figure 3.3, Tables 3.3 and 3.4). Histomorphometric analysis of the total growth plate height (Figure 3.5-A) and the heights of the different zones (Figure 3.5-B) of intra-vertebrae controls (Cd5 and Cd9) were similar in all studied groups (Tables 3.3 and 3.4). No change in the number of proliferative chondrocytes per column (Figure 3.5-C) and in the hypertrophic cell height (Figure 3.5-D) was found between all groups (Figure 3.5-C, Tables 3.3 and 3.4).

3.6 Discussion

This study enabled a comparison of similar average applied stresses between different dynamic loading regimens, isolating the effect of either the frequency or the stress variation. Our results showed that dynamic loadings of caudal vertebrae, with similar average compressive stresses, produced similar growth reductions. Only four animals per group could be treated because of technical limitations with the dynamic system. However, power calculations revealed that it was enough to detect statistical differences in terms of growth rate and growth plate heights (power value over 80%). The study was underpowered for zone-specific histomorphometric parameters namely number of cells per column in the proliferative zone and hypertrophic cell height. To avoid detecting false significant differences, the p-value was established at 0.01.

3.6.1 Modulation of Bone Growth Rate Is Controlled by the Average Compressive Stress

Similar growth rates were obtained following variations of frequency (0.1 Hz *versus* 1.0 Hz) in Dyn (a) or magnitudes (30% *versus* 100%) in Dyn (b). Results from Dyn (a) and Dyn (b), as well as from the dynamic group implemented by Valteau et al. characterized by a low magnitude (30%) and frequency (0.1 Hz) (Valteau, et al. 2011), support the hypothesis that modulation of bone growth rate is controlled by the average compressive stress. Our results are consistent with the experimental relationship between bone growth rates and mean compressive stress for the rat tail model of Stokes et al. (Stokes, et al. 2006), where a 45 days old rat caudal growth rate of 24.3 $\mu\text{m/day}$ could be associated with a 0.2 MPa compressive stress. Hence, the average compressive stress could be the key factor regulating changes in bone growth, as long as the oscillating frequency and the sustained peak compressive stresses remain within low ranges, hence maintaining the 0.2 MPa average stress within the tissue.

3.6.2 Increasing Both Frequency and Magnitude Might Create a More Severe Mechanical Condition for the Growth Plate Extracellular Matrix and/or Cells

In dynamic group (c), increases in frequency and magnitude were combined. Three rats were operated and all of them had local inflammations causing pain above the ethically acceptable threshold level. Rats had to be euthanized five days following the beginning of the experiments and could not complete the 15 days of loading. Each of them was operated separately at two weeks of interval, which removes the hypothesis of a systematic error. Fluoroscopic images taken during dissection showed appropriate implantation of the device. As chances of repeated inflammations in one group are very low, an etiologic hypothesis was formulated to explain the observed phenomenon. Loading combining extreme conditions of magnitude and frequency caused too much stress on the soft tissues (growth plate and intervertebral discs). Histological sections stained with toluidine blue showed the disorganization of the growth plate cells and the intervertebral disc, and therefore alteration of both growth plate and intervertebral disc integrities. Soft tissue changes induced by the traumatic procedure of pin track implantation combined with the extreme applied loading resulted in inflammation and necrosis of the tissue. This is supported

by an *in vivo* study on rabbits by Morissy et al. (Morissy and Haynes 1989) who showed that an intravenous injection of bacteria produced no infection, but that the combination of trauma and bacteria lead to the destruction of the growth plate tissue. The growth plate tissue is a time-dependent viscoporoelastic material (Villemure and Stokes 2009a). In the poroelastic model, the total stress, which corresponds to the applied external stress, is balanced by the effective stress within the solid matrix composed of the ECM and chondrocytes, and by the hydrostatic pressure of the fluid filling the pores (Cohen, et al. 1998). Using this model, the stress distribution between the matrix and the chondrocytes cannot be distinguished within the solid matrix. Future experimental studies would be required to gain insights on the stress-strain behavior and the stress distribution within the ECM and chondrocytes under different stress conditions.

3.6.3 Dynamic Growth Modulation Cannot Solely be Explained by Histomorphometric Changes

In this study, we found no significant differences in any of the measured histomorphometric parameters of the dynamic groups when compared with shams. One of the limitations of the study is the lack of information on the volumetric density of cells in the proliferative and hypertrophic zones (Hunziker, et al. 1987). Measured parameters could be improved by implementing stereological methods (three-dimensional and assumption-free methods). Moreover, it has been shown that histomorphometric changes were directly proportional to bone growth rate following sustained compression (Breur, et al. 1997; Breur, et al. 1991; Hunziker and Schenk 1989a; Hunziker, et al. 1987; Stokes 2002; Stokes, et al. 2002). A model was proposed to explain the growth plate parameters controlling bone growth. It included modifications in the cellular volume of hypertrophic chondrocytes, in the matrix composition especially in the hypertrophic zone and in the volumetric density of proliferative chondrocytes (Breur, et al. 1997; Stokes, et al. 2007; Stokes, et al. 2002; Wilsman, et al. 1996b). These assumptions were based on calculated cell cycle times with bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation by cells during their S-phase (Farnum and Wilsman 1993) and morphological parameters evaluated mainly at the hypertrophic zone (Breur, et al. 1994; Breur, et al. 1991). Growth is a complex process regulated by multiple factors (Hunziker 1994; Villemure and Stokes 2009a), controlled systemically and locally (Wilsman, et al. 1996a). Metabolic changes, such as the cell cycle, the stress-controlled hormonal release and the rate of synthesis and/or degradation of the extracellular matrix, could be

involved and responsible for modifying growth rate following dynamic loading. Future studies should for example include evaluation of cell cycle using BrdU, of ECM protein expression such as type II and X collagens, and of calcium homeostasis. In addition, experimental studies should investigate the effects of different loading rates, combining changes in magnitude and frequency, on stress distribution within the growth plate ECM and cells.

3.7 Conclusion

Increasing either magnitude or frequency led to growth reduction without histomorphometric changes. However, the combined augmentation of magnitude and frequency altered drastically growth plate integrity. Our results documented the impact of magnitude and frequency on compressive stress *in vivo*. These data are helpful for understanding growth plate mechanobiology and will be used for the design of novel implants for fusionless interventions in the early treatment of moderate scoliosis or angular deformities of the lower limbs.

3.8 Acknowledgements

There are no conflicts of interest concerning this paper. The authors acknowledge the contribution of the following laboratory team members: Charlotte Zaouter, Souad Rhalmi, Thierry Lafrance, Denise Carrier and the animal care technicians for their precious help and skills. Special thanks to Roxanne Wosu for the editorial review of the article. This study was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (I.V.), the Canada Research Chair in Mechanobiology of the Pediatric Musculoskeletal System (I.V.), and the NSERC/CREATE program (A.L.M.). G. Grimard owns stock options in the EMOVI Inc. company.

3.9 References

Akyuz, E., et al.

2006 Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth. Spine 31(25):E952-8.

Alberty, A., J. Peltonen, and V. Ritsila

1993 Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 64(4):449-55.

Alvarez, J., et al.

2000 Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 15(1):82-94.

Aronsson, D. D., and I. A. Stokes

2011 Nonfusion treatment of adolescent idiopathic scoliosis by growth modulation and remodeling. *J Pediatr Orthop B*.

Aronsson, D. D., et al.

1999 Mechanical modulation of calf tail vertebral growth: implications for scoliosis progression. *J Spinal Disord* 12(2):141-6.

Ballock, R.T., and R.J. O'Keefe

2003 The Biology of the Growth Plate. *Journal of Bone and Joint Surgery* 85:715-726.

Betz, R. R., et al.

2010 Vertebral body stapling: a fusionless treatment option for a growing child with moderate idiopathic scoliosis. *Spine* 35(2):169-76.

Breur, G. J., et al.

1997 The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates. *Calcif Tissue Int* 61(5):418-25.

Breur, G. J., et al.

1994 Stereological and serial section analysis of chondrocytic enlargement in the proximal tibial growth plate of the rat. *Anat Rec* 239(3):255-68.

Breur, G. J., et al.

1991 Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res* 9(3):348-59.

Bries, A. D., et al.

2012 A Study in Vivo of the Effects of a Static Compressive Load on the Proximal Tibial Physis in Rabbits. the Journal of bone and joint surgery. American volume 94-A.

Cancel, M., et al.

2009 Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix. Bone 44(2):306-15.

Cohen, B., W. M. Lai, and V. C. Mow

1998 A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis. Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme 120(4):491-496.

Farnum, C. E., and N.J. Wilsman

1993 Determination of Proliferative Characteristics of Growth Plate Chondrocytes by Labeling with Bromodeoxyuridine. Califed Tissue International 52:110-119.

Hunziker, E. B.

1994 Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. Microscopy research and technique 28(6):505-19.

Hunziker, E. B., and R. K. Schenk

1989 Physiological Mechanisms adopted by Chondrocytes in regulating Longitudinal bone growth in rats. Journal of Physiology 414:55-71.

Hunziker, E. B., R. K. Schenk, and L. M. Cruz-Orive

1987 Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. The Journal of bone and joint surgery. American volume 69(2):162-73.

Lowe, T. G., et al.

2000 Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. J Bone Joint Surg Am 82-A(8):1157-1168.

Mente, P. L., et al.

1999 Mechanical Modulation of Growth for the Correction of Vertebral Wedge Deformities. *Journal of Orthopaedic Research* 17:518-524.

Morissy, R.T. , and D.W. Haynes

1989 Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology. *JPO* 9:447-56.

Niehoff, A., et al.

2004 Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise. *Bone* 35(4):899-908.

Ohashi, N., et al.

2002 The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 17(2):284-92.

Robling, A. G., et al.

2001 Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone* 29(2):105-13.

Schmid, E. C., et al.

2008 A novel fusionless vertebral physseal device inducing spinal growth modulation for the correction of spinal deformities. *Eur Spine J*.

Sergerie, K., et al.

2009 Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. *Journal of biomechanics* 42(4):510-6.

Stokes, I. A.

2002 Mechanical effects on skeletal growth. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2(3):277-80.

Stokes, I. A., et al.

2006 Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. *Journal of orthopaedic research* 24(6):1327-34.

Stokes, I. A., et al.

2007 Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction. *Bone* 41(2):197-205.

Stokes, I. A., et al.

2002 Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 84A(10):1842-1848.

Stokes, I.A.F., et al.

2005 Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading. *Journal of Orthopaedic Research* 23:188-195.

Valteau, B., et al.

2011 In vivo dynamic bone growth modulation is less detrimental but as effective as static growth modulation. *Bone*.

Wall, E. J., et al.

2005 Endoscopic mechanical spinal hemiepiphysiodesis modifies spine growth. *Spine* 30(10):1148-53.

Wilsman, N. J., et al.

1996a Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 14(4):562-72.

Wilsman, N. J., et al.

1996b Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. *Journal of orthopaedic research* 14(6):927-36.

CHAPITRE 4 : ARTICLE 2 : BONE GROWTH RESUMPTION FOLLOWING IN VIVO STATIC AND DYNAMIC COMPRESSION REMOVAL ON RATS

Ce chapitre présente le second article rédigé dans le cadre de cette thèse et répondant à l'objectif spécifique 2 détaillé dans le Chapitre 2.

Cet article a été soumis dans *Journal of Bone and Mineral Research* le 16 mai 2015.

La contribution du premier auteur à la revue de littérature, la réalisation du protocole, l'obtention des résultats et l'écriture est estimée à 85%.

Description détaillée de la contribution de chacun des auteurs :

Anne-Laure Ménard : conception, réalisation du protocole expérimental, analyse et interprétation des résultats, rédaction et formatage de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

Guy Grimard : conception, chirurgie des animaux, interprétation des résultats, révision de l'article

Irène Londono : développement des méthodes expérimentales (colorations), interprétation des résultats, révision de l'article

Francis Beaudry : obtention de résultats (analyse des concentrations en neuropeptides)

Pascal Vachon : interprétation des résultats, révision de l'article

Florina Moldovan : conception, interprétation des résultats, révision de l'article

Isabelle Villemure : conception, interprétation des résultats, révision et corrections de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

4.1 Abstract

Mechanical loadings influence bone growth and are used in pediatric treatments of musculoskeletal deformities. This *in vivo* study aimed at evaluating the effects of static and dynamic compression application and subsequent removal on bone growth, mineralization and neuropathic pain markers in growing rats. Forty-eight immature rats (28 days) were assigned in two groups (2 weeks, 4 weeks) and four subgroups: control, sham, static, dynamic. Control subgroups had no surgery. A micro-loading device was implanted on the 6th and 8th caudal vertebrae of shams without loading, statics at compression of 0.2 MPa and dynamics at compression of 0.2 MPa \pm 30% at 0.1 Hz. In 2 weeks subgroups, compression was maintained full time for 15 days prior to euthanasia (43 days). In 4 weeks subgroups, compression was applied for 15 days and removed for 10 additional days before euthanasia (53 days). All rats lumbar spinal cords were collected for substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentrations for pain evaluation. Growth rates, histomorphometric parameters (total growth plate and zone heights, hypertrophic cell heights) and mineralization intensity were quantified. Results were compared between subgroups of each group with one-way ANOVA and post-hoc Tukey comparisons ($p < 0.05$). No significant difference was found in SP and CGRP concentrations in any groups. At 2 weeks, growth rates and growth plate heights of loaded groups (static/dynamic) were significantly lower than shams ($p < 0.01$). However, at 4 weeks, both growth rates and growth plate heights of loaded groups were similar to shams. At 4 weeks, alizarin red intensity was significantly higher in dynamics compared to shams ($p < 0.05$) and controls ($p < 0.01$). Both static and dynamic loadings enable growth resumption after loading removal, while preserving growth plate histomorphometric integrity. However, mineralization was enhanced after dynamic loading removal only. Dynamic loading showed promising results for fusionless treatment approaches of musculoskeletal deformities.

4.2 Keywords

Mechanical modulation; Growth rate; Growth plate histomorphometry; Mineralization; Pain peptides.

4.3 Introduction

Mechanical loadings are essential for bone growth and tissue health. In growing individuals, asymmetric loading or overloading contribute to the progression of musculoskeletal deformities such as adolescent idiopathic scoliosis (Stokes, et al. 2002), early onset scoliosis (Fletcher and Bruce 2012), limb asymmetries (Gorman, et al. 2009), genu varum (Greene 1993) or Blount's disease (Bries, et al. 2012; Greene 1993). Several *in vivo* animal studies (Alberty, et al. 1993; Robling, et al. 2001; Stokes, et al. 2006; Valteau, et al. 2011) provide evidence that compressive loading reduces bone growth rate while releasing compression accelerates it, according to the Hueter-Volkman principle (Aronsson, et al. 1999; Mente, et al. 1999). Innovative treatments such as fusionless or growth friendly (Fletcher and Bruce 2012; Skaggs, et al. 2013) devices are based on this principle using the patient's remaining growth potential to apply loadings to growth plates in order to reverse or halt the progression of the deformity (Skaggs, et al. 2013) while maintaining joint mobility. Several fusionless implants have been recently developed to correct moderate adolescent idiopathic scoliotic deformities during puberty (Samdani, et al. 2014) as well as more severe early onset scoliosis curves in younger pre-pubertal children (Fletcher and Bruce 2012). Upon correction of the deformity, these implants need to be removed, possibly with a remaining growth potential. However, it is not known if the physis would preserve their integrities and functionalities. In the literature, to our knowledge, no *in vivo* study has investigated the long-term effects of carefully controlled loading application and subsequent removal on bone growth and growth plate integrity.

Longitudinal bone growth takes place in growth plates or endplates, which are cartilaginous tissues situated at each end of long bones and vertebrae (Hunziker and Schenk 1989a; Hunziker, et al. 1987). Growth plates are composed of three zones: reserve, proliferative and hypertrophic, containing chondrocytes in different arrangements and sizes, embedded in an extracellular matrix (Ballock and O'Keefe 2003a). Hypertrophic chondrocytes increase their volume by 10-fold compared to proliferative chondrocytes during maturation (Hunziker, et al. 1987) until reaching their terminally differentiated stage prior to apoptosis (Ballock and O'Keefe 2003a). In particular, mechanical loading had little effect on proliferation but greatly influenced chondrocyte hypertrophy (Stokes 2002). *In vivo* studies in rats and rabbits reported bone growth rate reduction due to both static and dynamic compression (Ohashi, et al. 2002; Robling, et al. 2001; Valteau, et

al. 2011) along with decreases in growth plate height (Alberty, et al. 1993; Valteau, et al. 2011), proliferation (Alberty, et al. 1993), and hypertrophic cell height as a marker of hypertrophy (Valteau, et al. 2011). When comparing static *versus* dynamic loading, studies reported that dynamic loading better preserved growth plate integrity causing less morphologic changes to the growth plate (Valteau, et al. 2011). However, loading duration (Alberty, et al. 1993; Stokes, et al. 2005a) and magnitudes (Ohashi, et al. 2002; Robling, et al. 2001) were found to influence growth plate function. One of the few studies on the effects of loading removal on growth plate mechanobiology was conducted by Ohashi et al. (Ohashi, et al. 2002). They used external dynamic loading on a rat ulna model with three dynamic loading magnitudes for 10 min per day for 8 days followed by 7 days without loading (Ohashi, et al. 2002). According to our data, Sprague-Dawley rats used by Ohashi et al. at $170\text{g} \pm 10\text{g}$ would be in their pubertal growth spurt at 36-38 days old. They observed recovery of longitudinal bone growth in two groups with magnitudes within physiological ranges. Animals who experienced supra-physiological dynamic magnitude still had reduced growth, as well as morphologic changes of their distal growth plates, namely greater growth plate heights, and impaired mineralization (Ohashi, et al. 2002).

Mineralization and newly formed bone can be affected by mechanical loadings through the bone remodeling process referred to as Wolff's law (Turner 1998; Villemure and Stokes 2009a). In growing bones, no evidence report *in vivo* effects of physiological mechanical loading on early stages of mineralization in the hypertrophic growth plate zone and subsequently its relation to bone quality.

The *in vivo* rat tail model is commonly used to study growth and growth plate mechanobiology. Effects of mechanical loadings are investigated on the rat model through minimally invasive surgery of an external device implantation (Cancel, et al. 2008; Mente, et al. 1999). However, implantation surgery can cause tissue injuries, which in turn may lead to central neurogenic changes, modifying nociceptive signal transmission and modulation. In particular, substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) are nociceptive peptides, which play key roles in pain transmission and sensitisation (Basbaum 2004). Both peptides can be found in the spinal cord dorsal horn (Campbell and Meyers 2006). Following lesions in articulations (Ferland, et al. 2012; Ferland, et al. 2011a; Ferland, et al. 2011b) and tendons (Jafari, et al. 2015), these peptides concentrations increase and are associated with pain-related behaviors in rats. Therefore, it is

important to ensure that the surgical procedure and loading conditions do not cause additional long-term related pain, which would potentially affect tissues functions.

In the context of fusionless devices, additional loading would be applied full-time on patients until appropriate correction is obtained. The objective of this *in vivo* study using the rat tail model was to assess the effects of sequential full-time loading application and removal on bone growth, more specifically growth rate, histomorphometry, mineralization and neuropathic pain. The research hypotheses stated that (1) dynamic as opposed to static compression removal restores bone growth rate, (2) static loading affects growth plate histomorphometry and mineralization, while dynamic loading preserves it, and finally (3) both static and dynamic loadings cause neuropathic pain.

4.4 Methods

4.4.1 *In Vivo* Experimental Conditions

The Institutional Animal Care Committee approved the protocol. Forty-eight male Sprague-Dawley rats (28 days old) were divided into two groups (2 weeks and 4 weeks), each containing four subgroups: control, sham, static, dynamic (Table 4.1). In 2 weeks groups, compression was applied full time for 15 days before euthanasia (43 days old). In 4 weeks groups, compression was removed for 10 additional days before euthanasia (53 days old) (Figure 4.1-A, Table 4.1). In both 2 and 4 weeks groups, control subgroups had no surgery and sham subgroups had the device implanted without any loading. The device applied static (sustained) compression of 0.2 MPa or dynamic compression ranging from 0.14 MPa to 0.26 MPa (0.2 MPa \pm 30%) oscillating at 0.1 Hz.

Table 4.1: Experimental groups/subgroups: number of rats, age and weight at surgery and euthanasia (mean value \pm SD) with ^ap < 0.05 compared to controls.

Groups	Subgroups	Number of rats	Age at surgery [days]	Age at euthanasia [days]	Weight at surgery [g]	Weight at euthanasia [g]
2 weeks (15 days loading)	Control	n = 6	28	43	91.8 \pm 5.6	242.3 \pm 19.2
	Sham	n = 6	28	43	83.7 \pm 9.2	212.5 \pm 16.8 ^a
	Static	n = 6	28	43	89.0 \pm 8.2	221.5 \pm 11.0
	Dynamic	n = 6	28	43	89.2 \pm 3.4	217.5 \pm 15.1
4 weeks (15 days loading + 10 days unloading)	Control	n = 6	28	53	92.2 \pm 9.9	348.8 \pm 45.5
	Sham	n = 6	28	53	84.3 \pm 12.2	300.0 \pm 37.0
	Static	n = 6	28	53	83.5 \pm 18.0	292.2 \pm 29.7
	Dynamic	n = 6	28	53	81.3 \pm 6.0	328.0 \pm 39.9

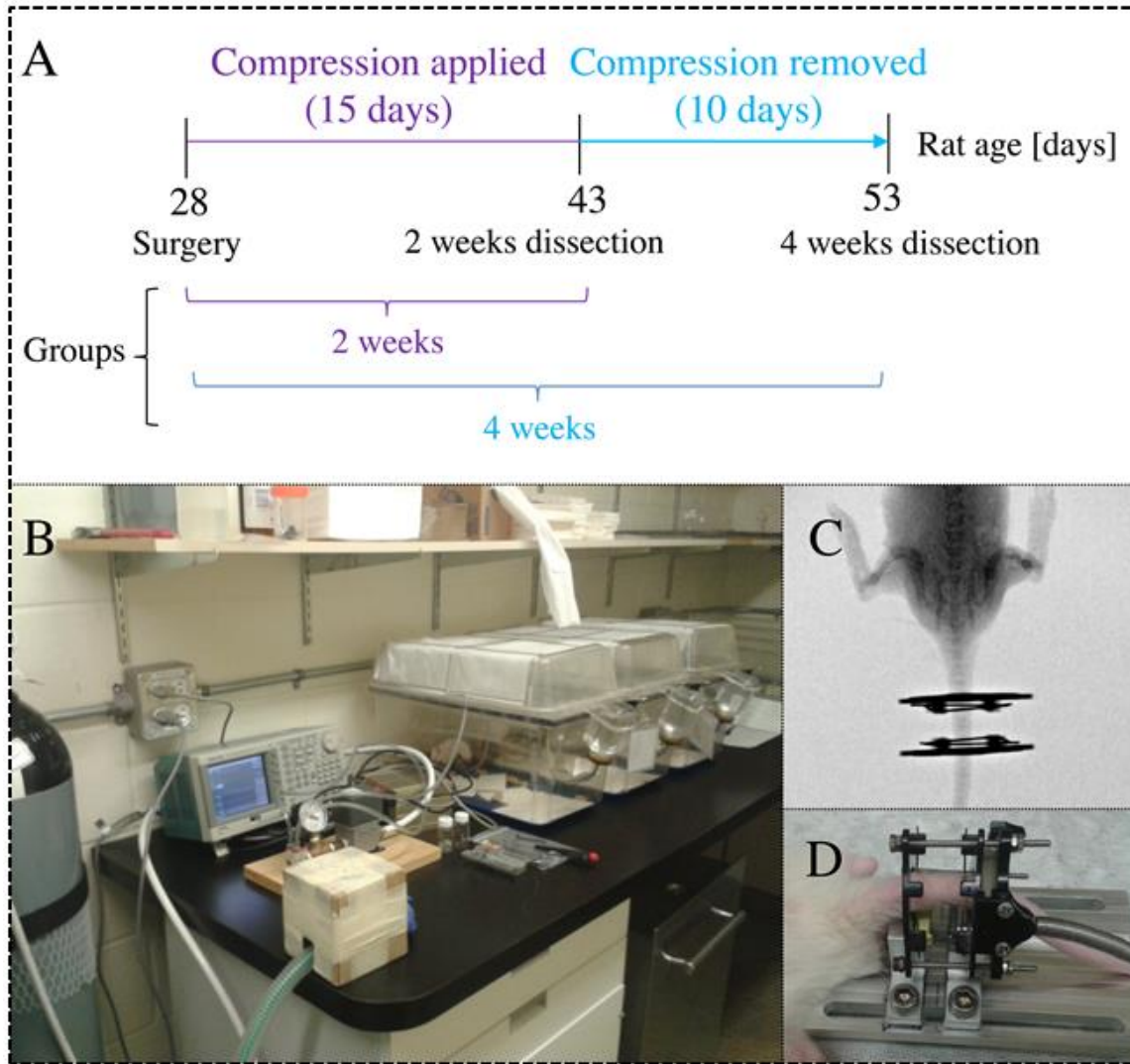


Figure 4.1: Experimental setup and design. A: Protocol timeline. B: Installation and rat housing. C: Fluoroscopic image of device implantation. D: Device daily adjustment.

4.4.2 Compression Device

The micro-loading device, inspired by Walsh et al. (Walsh and Lotz 2004), was implanted on the 6th and 8th caudal vertebrae to load the 7th caudal vertebra (Cd7). A bladder support was added at the distal extremity of the rat tail. Static and dynamic compressions were transmitted through bladder (DipTech Systems Inc, Kent, Ohio) inflation and/or deflation controlled by a pneumatic system, as described in previous studies (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). Prior to *in vivo* experimentation, bladders were calibrated using a micro-mechanical loading machine

(MACH-1, Biomomentum, Laval, QC, Canada) to determine force/voltage numerical relationship to adjust for transversal growth of caudal vertebra (Cancel, et al. 2008).

4.4.3 Surgical Procedure and Animal Care

Surgery was similar to previously published papers (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011), rats were anesthetized with isoflurane during the entire implantation procedure and had analgesic (Buprenorphine, 50 µg/kg, sc) and antibiotic (Baytril, 5 mg/kg, sc) injections (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). Vertebrae localization was performed with fluoroscopic images (GE OEC 9900 Elite) (Figure 4.1-C) (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). Rats recovered quickly following surgery, and were given *ad libitum* food and water (Figure 4.1-B). Compression was adjusted daily according to force/voltage relationship with use of a calibration guide to maintain fixations in parallel positions (Figure 4.1-B and D). For growth measurements, two calcein injections (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA; 15 mg/kg, ip) were performed five and two days prior to euthanasia. Rats were anesthetized with isoflurane before decapitation (Gil-Dones, et al. 2009).

4.4.4 Spinal Cord Collection and Analysis

Immediately following euthanasia, lumbar enlargement and first sacral segments of rat spinal cords were collected and preserved at -80°C until peptides analysis. Quantitative analysis was performed once all subgroups of rats within the same group were completed. SP and CGRP concentrations were obtained using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), similarly to literature parameters described by Ferland et al. (Ferland, et al. 2011a; Ferland, et al. 2011b). SP and CGRP concentrations were measured individually in spinal cord samples at 4 weeks, and the final subgroup value is reported as the average of six rats per subgroup.

4.4.5 Vertebrae Collection

Two caudal vertebrae were extracted: Cd5 as within-animal control and Cd7 loaded vertebra. Vertebrae were fixed in formalin, dehydrated and clarified before methylmetacrylate embedding (Fisher Scientific Canada, Nepean, ON, Canada). Both vertebrae were cut along their longitudinal axis in 6 µm sections using a microtome (Leica SM2500), at vertebra center (Figure

4.2-A). The first slide of each series was stained with toluidine blue for histomorphometric measurements (growth plate heights, zone heights, hypertrophic cell heights). The second slide was mounted for growth rate measurements. The third slide was stained with alizarin red for calcium mineral deposit assessment (Kirsch, et al. 2003) and quantification. Slices were observed under a microscope (Leica DMR with RetigaQimaging Camera) using 5X fluorescent light for growth rates (calcein labeling), 10X bright light for total growth plate heights, zone heights and calcification, and 20X for hypertrophic cell heights.

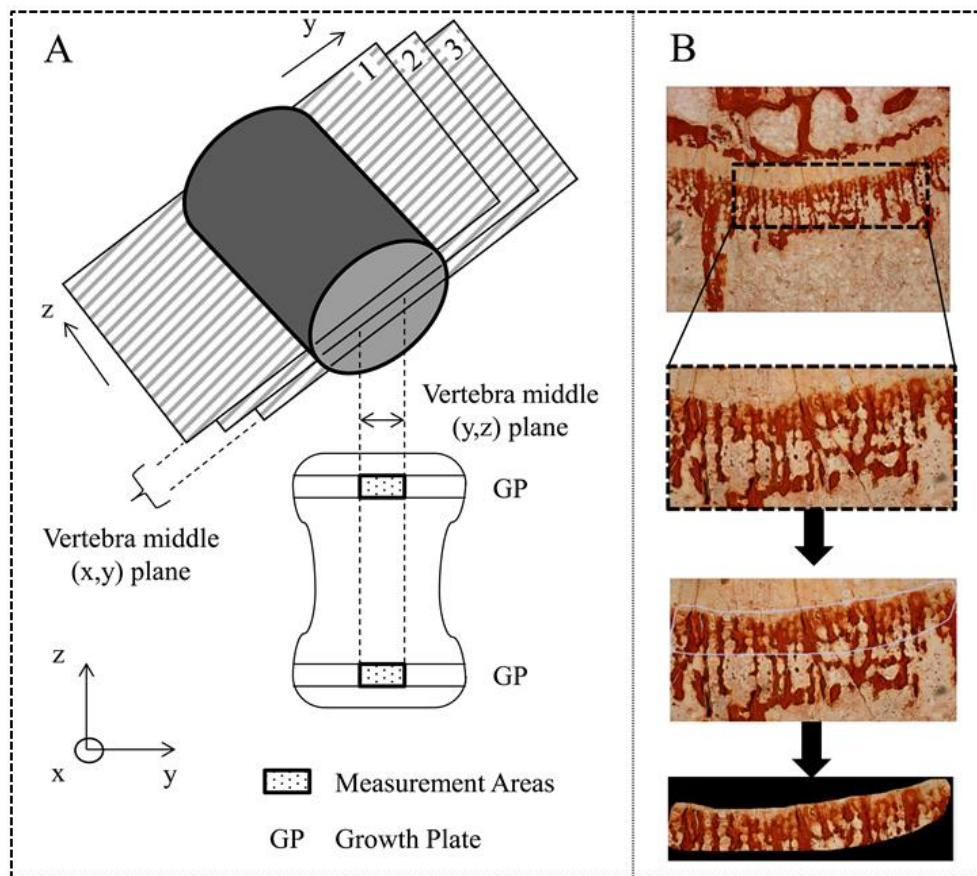


Figure 4.2: Measurements on microtome slices. A: Selection of three planes cutting through vertebra center and measurements on both proximal and distal growth plates (GP). B: Alizarin red pixels intensity quantification using a custom-designed clustering method (Matlab).

4.4.6 Growth Rate and Histomorphometric Parameters

Growth rates and histomorphometric parameters were measured at the transversal center of each vertebra on three consecutive series (Figure 4.2-A). Vertebrae center were determined by visual

comparison between series under the microscope at low magnification (2.5X). In each series, both distal and proximal growth plates were imaged at the longitudinal center of the vertebra on three planes (Figure 4.2-A). All quantitative measurements were performed using a Matlab program, similarly to previously published work (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). Growth rates were obtained by calculating the distance between both calcein labels along the longitudinal growth axis divided by the time interval between injections (3 days) (Valteau, et al. 2011). The final growth rate represented the average of six values (i.e. both proximal and distal growth plates on three planes). Total growth plate heights as well as proliferative and hypertrophic zone heights were obtained with semi-automated spline interpolation (Valteau, et al. 2011), by averaging six values. Hypertrophic cell heights were measured by averaging the 15 largest cells of the slice, on six slices, for a total of 90 cells per vertebra (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011).

4.4.7 Mineralization

Mineralization evaluation was performed from alizarin red stained tissue sections of the vertebra (Figure 4.2-A), in duplicate. Pigmentation uptake manifests itself as intensity of red-stained pixels, which is proportional to calcification (Anderson, et al. 2004; Kirsch, et al. 2003). To quantify the intensity (expressed as a number of pixels), computer-based Matlab program was used based on segmentation clustering methods on the red channel. Quantification measured an averaged pixels intensity of the early calcification zone, termed as the histologic zone of provisional calcification (Figure 4.2-B) (Tsai, et al. 2013).

4.4.8 Statistical Comparison

Statistical analyses were conducted in each group (2 weeks, 4 weeks) separately. For each group, a one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was completed between the mean values of each parameter of each experimental subgroup. One-way ANOVA's were performed separately for each vertebra (within-animal control Cd5, loaded Cd7). Tukey's post-hoc comparisons between groups enabled identification of differences between groups. In the tables, results are presented as mean values \pm standard deviations together with two significant levels ($p < 0.05$ and $p < 0.01$).

4.5 Results

Rats had similar weight at surgery day for both 2 and 4 weeks groups (Table 4.1). At dissection, significantly lower body weight was observed between 2 weeks shams and controls ($p = 0.019$) (Table 4.1) but no other differences were reported in loaded groups or at 4 weeks.

4.5.1 Substance P and CGRP Concentrations were not Modulated by Static nor Dynamic Loadings

Neither the surgical procedure nor additional loading affected SP and CGRP concentrations. SP and CGRP concentration levels were similar in controls compared to shams or loaded rats at 4 weeks (Table 4.2). Moreover, animals from all groups showed no behavioural pain such as movement reduction, posture modifications or other traumatic signs.

Table 4.2: Pain peptides concentration (mean value \pm SD) at 4 weeks in lumbar spinal cord. SP: substance P, and CGRP: calcitonin gene-related peptide.

Group	Subgroups	SP [pmol/g]	CGRP [pmol/g]
4 weeks (15 days loading + 10 days unloading)	Control	103.6 \pm 16.7	2322.9 \pm 111.4
	Sham	114.6 \pm 16.8	2304.0 \pm 132.7
	Static	117.7 \pm 21.6	2336.7 \pm 270.2
	Dynamic	113.1 \pm 18.7	2688.2 \pm 363.6

4.5.2 Cd7 Growth Rate (GR) is Modulated After 2 Weeks of Loading (2 Weeks Group) but Resumes Following Both Static and Dynamic Unloading (4 Weeks Group)

2 weeks growth rates mean values were similar for both static and dynamic subgroups, but significantly reduced by 20.1% and 19.7% respectively compared to shams ($p < 0.001$) (Figure 4.3-A, Table 4.3), and 22.4% and 22% compared to controls ($p < 0.001$) (Figure 4.3-A, Table

4.3). No significant differences were found between shams and controls in the 2 weeks group. In the 4 weeks group, growth rates of both static and dynamic groups showed no significant differences with shams. However, 4 weeks static, dynamic and shams had 17.9%, 14.6%, and 12.5% reduction in growth rates compared to controls ($p < 0.001$) (Figure 4.3-A, Table 4.3).

Table 4.3: Growth rate and histomorphometric results for the loaded vertebra Cd7 (mean value \pm SD) with ^a $p < 0.05$ and ^{aa} $p < 0.01$ compared to shams, and with ^b $p < 0.05$ and ^{bb} $p < 0.01$ compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).

Groups	Cd7 vertebra	GR [$\mu\text{m}/\text{day}$]	GPH [μm]	CH (HZ) [μm]	Alizarin intensity
2 weeks (15 days loading)	Control (n= 6)	37.7 ± 2.1	202.9 ± 6.1	33.1 ± 1.2	$170,6 \pm 1.9$
	Sham (n= 6)	37.0 ± 1.2	194.4 ± 8.2	32.1 ± 0.8	$170,6 \pm 2.2$
	Static (n = 6)	$30.8 \pm 1.0^{\text{aa,bb}}$	$174.1 \pm 4.2^{\text{aa,bb}}$	$30.2 \pm 1.9^{\text{b}}$	$172,1 \pm 2.4$
	Dynamic (n = 5)	$30.9 \pm 0.6^{\text{aa,bb}}$	$175.5 \pm 8.5^{\text{aa,bb}}$	$29.5 \pm 2.5^{\text{b}}$	$175,0 \pm 4.1$
4 weeks (15 days loading + 10 days unloading)	Control (n= 6)	36.8 ± 1.3	199.9 ± 8.7	29.1 ± 0.9	$169,7 \pm 1.7$
	Sham (n= 6)	$32.7 \pm 1.8^{\text{bb}}$	$175.5 \pm 5.8^{\text{bb}}$	28.9 ± 2.6	$171,0 \pm 4.5$
	Static (n = 6)	$31.2 \pm 1.0^{\text{bb}}$	$175.7 \pm 9.6^{\text{bb}}$	28.0 ± 1.2	$174,1 \pm 2.3$
	Dynamic (n = 6)	$32.1 \pm 1.0^{\text{bb}}$	$175.6 \pm 8.1^{\text{bb}}$	28.5 ± 2.6	$175,9 \pm 1.7^{\text{a,bb}}$

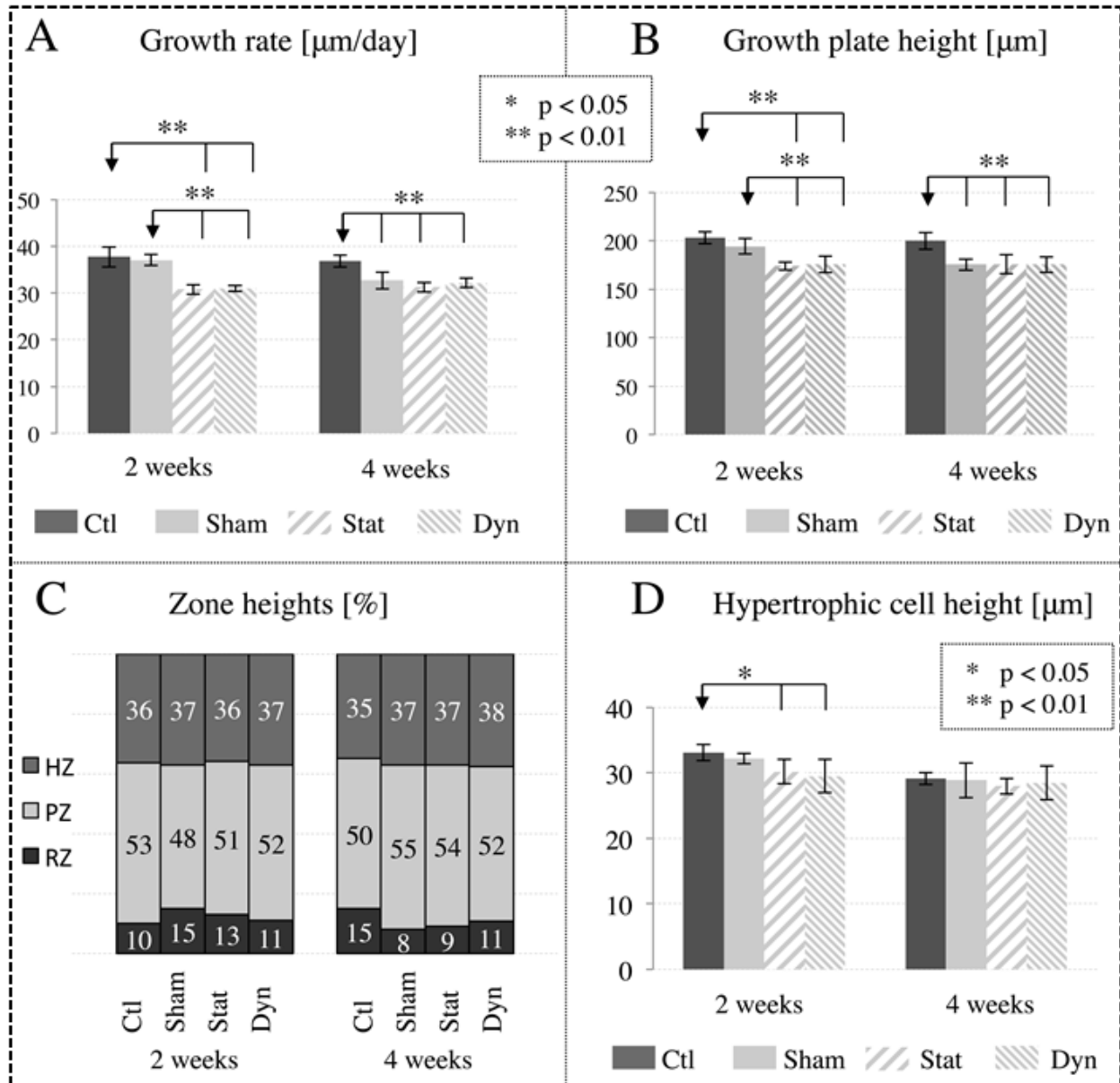


Figure 4.3: Growth results for Cd7. A: Growth rates. B: Total growth plate height. C: Growth plate zonal height percentages with RZ: reserve zone, PZ: proliferative zone and HZ: hypertrophic zone. D: Hypertrophic cell heights. In A through D: the arrow indicates the reference group used in comparisons.

4.5.3 Cd7 Total Growth Plate Height (GPH) is Modulated Similarly to Cd7 Growth Rates

Similar results were observed for total growth plate heights in 2 and 4 weeks groups. Total growth plate height was significantly lowered in 2 weeks static and dynamic rats compared to shams ($p < 0.001$ and $p = 0.0014$ respectively) and controls ($p < 0.001$ for both) (Figure 4.3-B, Table 4.3). Following loading removal at 4 weeks, no differences were observed between shams, statics and dynamics. However, these three subgroups had lower total growth plate heights compared to controls ($p < 0.001$) (Figure 4.3-B, Table 4.3).

4.5.4 Cd7 Growth Plate Zone Heights are Similar in All Groups

All rat growth plates had similar zonal arrangements in both 2 and 4 weeks groups (Figure 4.3-C, Table 4.3). Hypertrophic zone percentages were similar in all groups, ranging from 36-37% at 2 weeks and 35-38% at 4 weeks (Figure 4.3-C). Proliferative zone percentages were around 50-55% in all groups; a lower value was found in the 2 weeks sham group, which was compensated by a higher reserve zone percentage (Figure 4.3-C). The reserve zone, which border with the early proliferative zone was harder to define in rat growth plates, had the lowest contribution around 10-15% in the different subgroups (Figure 4.3-C).

4.5.5 Cd7 Hypertrophic Cell Height (CH) is Reduced in 2 Weeks Static and Dynamic Subgroups but is Restored at 4 Weeks

No statistical differences were observed in Cd7 hypertrophic cell height at 2 weeks between static, dynamic and shams (Figure 4.3-D, Table 4.3). However, both static and dynamic subgroups had smaller chondrocytes in the hypertrophic zone compared to controls ($p = 0.037$ and $p = 0.012$ respectively) (Figure 4.3-D, Table 4.3). This significant difference disappeared at 4 weeks, where all subgroups had similar hypertrophic chondrocytes heights (Figure 4.3-D, Table 4.3).

4.5.6 Cd7 Mineralization is Similar at 2 Weeks but is Increased Significantly in 4 Weeks Dynamic Subgroup

No significant difference in mineralization intensity was observed between subgroups at 2 weeks (Figure 4.4-A and B, Table 4.3). At 4 weeks, a trend of higher mineralization was seen in the static subgroup, although non-significant. However, the dynamic subgroup had significantly higher alizarin red intensity compared to shams ($p = 0.029$) and controls ($p = 0.0052$) (Figure 4.4-A and B, Table 4.3).

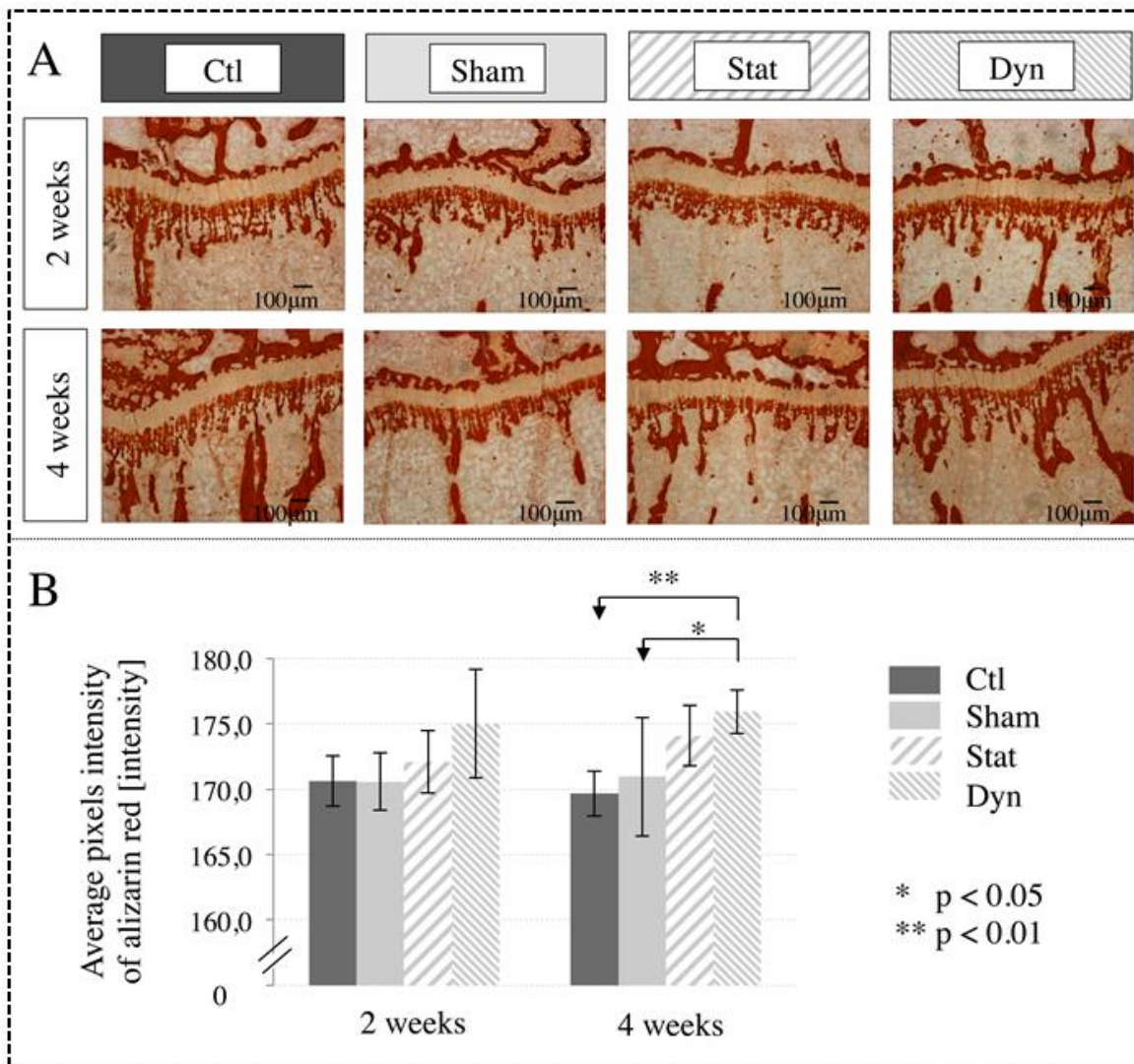


Figure 4.4: Mineralization results for Cd7. A: Optic microscope images of growth plates stained with alizarin red (10X) with scale bar representing 100 μ m. B: Alizarin red pixels intensity assessment.

4.5.7 Cd5 Within-Animal Control Vertebra is Showing Similar Growth Rates and Histomorphometric Parameters in Both 2 and 4 Weeks Groups, but Different Calcification Intensities at 2 Weeks

In Cd5 vertebrae, no significant differences were found in the growth rates and histomorphometric parameters of subgroups within each group (2 and 4 weeks) (Table 4.4). However at 2 weeks, Cd5 calcification intensity was increased in the dynamic group compared to controls ($p = 0.0032$) (Table 4.4).

Table 4.4: Growth rate and histomorphometric results for the within-animal control vertebra Cd5 (mean value \pm SD) with ^a $p < 0.05$ and ^{aa} $p < 0.01$ compared to shams, and with ^b $p < 0.05$ and ^{bb} $p < 0.01$ compared to controls. GR: growth rate, GPH: growth plate height, CH: chondrocyte height in the hypertrophic zone (HZ).

Groups	Cd5 vertebra	GR [$\mu\text{m/day}$]	GPH [μm]	CH (HZ) [μm]	Alizarin intensity
2 weeks (15 days loading)	Control (n= 6)	34.1 ± 1.0	180.9 ± 6.3	30.3 ± 0.9	170.6 ± 1.5
	Sham (n= 6)	34.4 ± 0.5	181.1 ± 7.7	30.4 ± 1.8	172.8 ± 1.7
	Static (n = 6)	33.6 ± 0.7	177.6 ± 6.8	29.7 ± 1.4	172.7 ± 1.1
	Dynamic (n = 6)	34.3 ± 0.8	181.1 ± 4.9	29.9 ± 1.7	$174.7 \pm 2.2^{\text{bb}}$
4 weeks (15 days loading + 10 days unloading)	Control (n= 6)	34.4 ± 0.6	174.1 ± 9.1	27.5 ± 1.3	173.3 ± 2.7
	Sham (n= 6)	34.4 ± 0.3	171.5 ± 9.3	28.1 ± 1.6	172.8 ± 2.8
	Static (n = 6)	34.8 ± 0.5	176.9 ± 5.4	27.7 ± 1.2	172.9 ± 2.6
	Dynamic (n = 6)	34.4 ± 0.6	171.7 ± 3.3	28.0 ± 1.8	177.1 ± 3.3

4.6 Discussion

This study investigated the effects of moderate stress-equivalent static *versus* dynamic compression application and subsequent removal. Bone growth, growth plate histomorphometric parameters, mineralization and neuropathic pain were assessed. Firstly, bone growth and histomorphometric parameters were similarly modulated by both static and dynamic compression. Secondly, loading type was discriminated on mineralization level intensities, which was found to increase in the dynamic groups, immediately after loading and following 10 days of loading removal. Thirdly, neurogenic pain-related peptide analysis surprisingly showed that there was no long-term neurogenic pain associated with the surgical procedure as well as with the application and removal of static or dynamic compressions. Both SP and CGRP concentrations were found to be within normal ranges, similarly to control rats of other studies (Ferland, et al. 2012; Ferland, et al. 2011a).

4.6.1 Bone Growth is Modulated by Both Static and Dynamic Compression Application and Removal

Similar bone growth rates were obtained following loading application and subsequent removal. After 2 weeks of compression, our results are comparable to growth modulation values in the literature, confirming no differences in growth rates between static (Stokes, et al. 2006; Valteau, et al. 2011) and dynamic compressions (Valteau, et al. 2011). No growth-related sham effect was observed at 2 weeks. In this protocol, reduced body weight in shams could be related to additional stress induced by the surgical procedure, although minimally invasive. However, male rats of the same age can have weight variations up to 100g during puberty (Sengupta 2013). Hence, factors causing weight reduction in shams compared to controls are not clearly determined. From age 35 to 43 days, rats are at their growth spurt with highest growth rates (Hunziker and Schenk 1989a), while 50 days of age marks the end of their growth spurt (Sengupta 2013). After loading removal (43 days old), growth rates of static and dynamic groups remained similar to those at 2 weeks, which is in line with the values of the control group. However, when comparing sham rats at 2 and 4 weeks, growth rates decreased. More specifically, a sham effect became apparent and quantifiable in the span of the 10 unloading days, without compression but with the device maintained in place. No significant growth rate

difference was observed at 4 weeks between shams and loaded groups. Altogether, these results support the hypothesis of bone growth resumption, or mild catch-up growth described by other studies in rats (Marino, et al. 2008; Reich, et al. 2008) and rabbits (Gafni 2001) once the cause of growth reduction was removed. Catch-up growth is defined as growth increase beyond its normal curve after a period of temporary growth inhibition (Boersma and Wit 1997). Reich et al. investigated the effects of static loading (Reich, et al. 2005) and loading removal (Reich, et al. 2008) with sandbags on young chicks. They found catch-up growth following loading removal (Reich, et al. 2008). Compared to this study, their removal period was longer (5 days) than their loading period (4 days), which could therefore affect growth plate performance and subsequent longitudinal growth rate. Our loaded groups compensated for the sham-related growth reduction due to device implantation itself but did not exceed control rat growth. A longer unloading period compared to the loading period could have revealed faster growth rates after loading removal.

4.6.2 Growth Plate Histomorphometry is Preserved After Both Static and Dynamic Loading Removal

In terms of growth plate zonal organization and histomorphometric parameters, 2 weeks numerical values are similar to previous work (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). Valteau et al. reported positive correlation between growth rates and growth plate heights, which were thinner in rats submitted to both static and dynamic compressions at 0.2 MPa for 2 weeks (Valteau, et al. 2011). At 4 weeks, growth plate total height was lower in static and dynamic groups compared to controls, but no more differences were observed with shams. These observations differ from the associated growth plate height increased of 127% reported by Reich et al. along with catch-up growth phenomenon (Reich, et al. 2008). Unloading duration might play a role in the capacity of the growth plate to recover its normal dimensions. Although the applied stress was within physiological ranges, full-time loading is not physiological (Stokes, et al. 2005a). Our results suggest that loading type with the same averaged moderate stress of 0.2MPa did not alter growth plate integrity, and did not discriminate between static and dynamic regimens.

4.6.3 Mineralization is Increased in Dynamic Loading Even After Compression Removal, Compared to Controls, and Does not Correlate With Endochondral Bone Growth

Alizarin red showed increased calcium accumulation in dynamic loading subgroups compared to controls and shams at 4 weeks, but did not provide more information about the mineralization process itself. It has been established that mineralization is controlled by hypertrophic chondrocytes and that matrix vesicles initiate mineralization by calcium ions Ca^{2+} accumulation in its lumen, which is the first phase of mineralization (Anderson 2003). The second phase is propagation, where phospholipase and protease release hydroxyapatite crystals from matrix vesicles on type II and X collagens acting as a scaffold for further crystal growth. Metalloproteinases are also key matrix components enabling mineralization, as they degrade mineralization inhibitors such as proteoglycans (Anderson 2003), osteocalcin, osteonectin, inorganic pyrophosphate, fetuin (Anderson and Shapiro 2010). Moreover, apoptosis of the hypertrophic chondrocytes could also contribute to accelerate mineralization as the remaining space allow calcium accumulation without alkaline-phosphatase nor annexins, although mechanisms are still unclear (Kirsch, et al. 2003). Under dynamic loading stimulation, it is most likely that matrix turnover and metabolism are increased in favor of an accelerated mineral density deposition. In fact, cyclic dynamic loading favor more active fluid flow, therefore stimulating ions and other molecule transportation and exchanges (Klein-Nulend, et al. 2013), which might contribute to the observed increased mineralization. Our results also showed that higher mineralization in the early stages does not correlate endochondral bone growth, which has been pointed out in the literature (Wongdee, et al. 2012). Whether higher mineral deposition in later stages of mineralization leads to stronger and higher bone quality remains unknown.

4.6.4 Limitations

This study has some limitations. Firstly, no follow-up could be performed in the same animal group as current histology methods require animal sacrifice to obtain growth and histomorphometric measurements. New imaging techniques are currently been developed to enable accurate thorough evaluation of bone growth and mineralization following loading. These techniques would provide a follow-up of the same rat cohort, therefore allowing more conditions

to be tested with minimal animal number requirements and in the same animals. Secondly, it would have been interesting to investigate proliferation rates using BrdU to confirm potential growth plate senescence delay as observed during catch-up growth (Boersma and Wit 1997). As well, longer loading and/or removal time, or an even time period ratio of loading/unloading, should be investigated. Thirdly, mineralization was assessed using a semi-quantitative approach based on alizarin red staining but additional biomolecular analyses were not implemented. The loading-sensitive mechanisms in this study remain to be elucidated. In addition, mineralization analyses were performed in the early stages of mineralization before crystal formation. Therefore, later stages of mineralization from crystal growth to primary spongiosa and further remodeling were out of the scope of this study.

4.6.5 Conclusion

This study showed that growth resumption occurs following both static and dynamic compressive loadings removals at physiological levels. Along with its preserved functionality, the growth plate integrity in terms of zonal repartition and hypertrophic chondrocyte heights was maintained in both static and dynamic cases. However, mineralization discriminated between loading types as it was significantly up regulated after dynamic loading removal. Dynamic loading could produce a combined anabolic effect on bone growth and bone remodeling responses. Future studies should look into bone quality using *in vivo* microCT and investigate biomolecular mechanisms relating bone growth and mineralization in order to better understand soft tissue (growth plate) and hard tissue (bone) interactions and adaptations to loading within physiological ranges. This knowledge could be key to provide optimal compression-based fusionless treatments to growing patients with musculoskeletal deformities.

4.7 Acknowledgements

The authors acknowledge helpful contributions and technical skills of laboratory team members in particular Aurélie Benoit, Charlotte Zaouter, Souad Rhalmi, as well as Sainte-Justine University Hospital animal care technicians. More specifically, the authors would like to thank Rosa Kaviani for sharing her quantification program for alizarin red staining measurements. Funding for this study was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (I.V.), the Canada Research Chair in Mechanobiology of the Pediatric

Musculoskeletal System (I.V.), the NSERC/CREATE program (ALM) and the Network for Oral and Bone Health Research (RSBO) (ALM). G. Grimard is a consultant and shareholder at Emovi Inc.

4.8 Authors' roles

Study design: ALM, IV, GG, FM. Study conduct: ALM, GG, IL, FB. Data interpretation: ALM, IV, GG, FM, PV. Approving final version of manuscript: ALM, IV, GG, FM IL, FB, PV. ALM takes responsibility for the integrity of the data analysis.

4.9 References

Alberty, A., J. Peltonen, and V. Ritsila

1993 Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 64(4):449-55.

Anderson, H. C.

2003 Matrix Vesicles and Calcification. *Crystal Arthritis*:222-226.

Anderson, H. C., and I. M. Shapiro

2010 The Epiphyseal Growth Plate. *In Bone and Development*. F. Bronner, M.C. Farach-Carson, and H.I. Roach, eds. Pp. 39-64.

Anderson, H. C., et al.

2004 Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. *American Journal of Pathology* 164(3):841-847.

Aronsson, D. D., et al.

1999 Mechanical modulation of calf tail vertebral growth: implications for scoliosis progression. *J Spinal Disord* 12(2):141-6.

Ballock, R.T., and R.J. O'Keefe

2003 The Biology of the Growth Plate. *Journal of Bone and Joint Surgery* 85:715-726.

Basbaum, A. I.

2004 Molecular approaches to understanding to anatomical substrates of nociceptive processing. *In* The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians, Progress in pain research and management. L. Villaneuva, A.H. Dickenson, and H. Ollat, eds. Seattle: IASP Press.

Boersma, B., and J. M. Wit

1997 Catch-up Growth. *Endocr Rev* 18(5):646-661.

Bries, A. D., et al.

2012 A Study in Vivo of the Effects of a Static Compressive Load on the Proximal Tibial Physis in Rabbits. *the Journal of bone and joint surgery. American volume* 94-A.

Campbell, James. N., and Richard. A. Meyers

2006 Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*. 52(1):77-92.

Cancel, M., et al.

2009 Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix. *Bone* 44(2):306-15.

Ferland, C. E., F. Beaudry, and P. Vachon

2012 Antinociceptive Effects of Eugenol Evaluated in a Monoiodoacetate-induced Osteoarthritis Rat Model. *Phytother. Res.* 26:1278-1285.

Ferland, C. E., et al.

2011a Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 97:603-610.

Ferland, C. E., et al.

2011b Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45:423-429.

Fletcher, N. D., and R. W. Bruce

2012 Early onset scoliosis: current concepts and controversies *Pediatrics* 5:102-110.

Gafni, R. I.

2001 Catch-Up Growth Is Associated with Delayed Senescence of the Growth Plate in Rabbits. *Pediatr Res* 50(5):618-623.

Gil-Dones, F., et al.

2009 An Optimal Protocol to Analyze the Rat Spinal Cord Proteome. *Biomarker Insights* 4:135-164.

Gorman, T. M., et al.

2009 Mechanical axis following staple epiphysiodesis for limb-length inequality. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 91(10):2430-9.

Greene, W. B.

1993 Infantile tibia vara. *Instructional course lectures* 42:525-38.

Hunziker, E. B., and R. K. Schenk

1989 Physiological Mechanisms adopted by Chondrocytes in regulating Longitudinal bone growth in rats. *Journal of Physiology* 414:55-71.

Hunziker, E. B., R. K. Schenk, and L. M. Cruz-Orive

1987 Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 69(2):162-73.

Jafari, L., et al.

2015 Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. *Physiol. Rep.* 3(1).

Kirsch, T., W. Wang, and D. Pfander

2003 Functional Differences Between Growth Plate Apoptotic Bodies and Matrix Vesicles. *J Bone Miner Res* 18(10):1872-1881.

Klein-Nulend, J., et al.

2013 Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 54:182-190.

Marino, R., et al.

2008 Catch-up growth after hypothyroidism is caused by delayed growth plate senescence. *Endocrinology* 194(4):1820-1828.

Ménard, A-L., et al.

2014 In Vivo Dynamic Loading Reduces Bone Growth Without Histomorphometric Changes of the Growth Plate. *Journal of Orthopaedic Research*.

Mente, P. L., et al.

1999 Mechanical Modulation of Growth for the Correction of Vertebral Wedge Deformities. *Journal of Orthopaedic Research* 17:518-524.

Ohashi, N., et al.

2002 The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 17(2):284-92.

Reich, A, Sharir A, Zelzer E, Hacker L, Monsonogo-Ornan E, Shahar R.

2008 The effect of weight loading and subsequent release from loading on the postnatal skeleton. *Bone* 43(4):766-74.

Reich, A., et al.

2005 Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization. *J Appl Physiol* 98(6):2381-9.

Robling, A. G., et al.

2001 Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone* 29(2):105-13.

Samdani, A. F., et al.

2014 Anterior Vertebral Body Tethering for Idiopathic Scoliosis. *Spine* 39(20):1688-1693.

Sengupta, P.

2013 The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*:624-630.

Skaggs, D. L., et al.

2013 A Classification of Growth Friendly Spine Implants. *J Pediatr Orthop*

Stokes, I. A.

2002 Mechanical effects on skeletal growth. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2(3):277-80.

Stokes, I. A., et al.

2006 Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. *Journal of orthopaedic research* 24(6):1327-34.

Stokes, I. A., et al.

2005 Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading. *J Orthop Res* 23(1):188-95.

Stokes, I. A., et al.

2002 Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading. *Journal of Bone and Joint Surgery-American* Volume 84A(10):1842-1848.

Tsai, A., et al.

2013 Discordant radiologic and histological dimensions of the zone of provisional calcification in fetal piglets. *Pediatr Radiol* 43:1606-1614.

Turner, C. H.

1998 Three Rules for Bone Adaptation to Mechanical Stimuli. *Bone* 23(5):399-407.

Valteau, B., et al.

2011 In vivo dynamic bone growth modulation is less detrimental but as effective as static growth modulation. *Bone*.

Villemure, I., and I. A. Stokes

2009a Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *Journal of Biomechanics* 42(12):1793-803.

Walsh, A. J., and J. C. Lotz

2004 Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading. *Journal of biomechanics* 37(3):329-37.

Wongdee, K., N. Krishnamra, and N. Charoenphandhu

2012 Endochondral bone growth, bone calcium accretion and bone mineral density: how are they related? *J Physiol Sci* 62:299-307.

CHAPITRE 5 : ARTICLE 3 : STATIC AND DYNAMIC COMPRESSION APPLICATION AND REMOVAL ON THE INTERVERTEBRAL DISCS OF GROWING RATS

Ce chapitre présente le troisième article rédigé dans le cadre de cette thèse et répondant à l'objectif spécifique 3 détaillé dans le Chapitre 2.

Cet article a été soumis dans le *Journal of Orthopaedic Research* le 29 avril 2015.

La contribution du premier auteur à la revue de littérature, la réalisation du protocole, l'obtention des résultats et l'écriture est estimée à 85%.

Description détaillée de la contribution de chacun des auteurs :

Anne-Laure Ménard : conception, réalisation du protocole expérimental, analyse et interprétation des résultats, rédaction et formatage de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

Guy Grimard : conception, chirurgie des animaux, interprétation des résultats, révision de l'article

Élise Massol : choix méthodologiques, obtention de résultats, analyse et interprétation des résultats, révision de l'article

Irène Londono : développement des méthodes expérimentales (colorations), analyse et interprétation des résultats, révision de l'article

Florina Moldovan : conception, organisation et interprétation des résultats, révision de l'article

Isabelle Villemure : conception, interprétation des résultats, révision et corrections de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

5.1 Abstract

Purpose: Fusionless implants are used to correct pediatric progressive spinal deformities, most of them spanning the intervertebral disc. This study aimed at investigating the effects of *in vivo* static *versus* dynamic compression application and removal on discs of growing rats.

Methods: A microloading device applied compression. 48 immature rats were divided into two groups (2 weeks, 4 weeks). Each group included four subgroups: control (no surgery), sham (device installed without loading), static (0.2 MPa) and dynamic compressions (0.2 MPa +/- 30% with 0.1 Hz). In 2 weeks subgroups, compression was applied for 15 days. In 4 weeks subgroups, compression was followed by 10 days without loading. Disc heights, nucleus/annulus proportions and nucleus proteoglycan contents were analyzed using one-way ANOVA and post-hoc Tukey comparisons ($p < 0.05$).

Results: Disc heights of 2 and 4 weeks static and dynamic rats were lower than shams ($p < 0.05$). Nucleus *versus* annulus proportions remained similar. At 2 weeks, nucleus proteoglycan contents increased in both static and dynamic rats. However, at 4 weeks, static rats had lower proteoglycan content than dynamic rats ($p < 0.05$).

Conclusion: Disc structure is altered following static compression removal, but nucleus proteoglycan content remaining elevated in dynamic group. Dynamic fusionless implants would better preserve disc integrity.

5.2 Keywords

In vivo static/dynamic compression; intervertebral disc; histomorphometry; proteoglycan; microCT.

5.3 Introduction

New fusionless treatments have recently been developed to treat young patients with mild to moderate spinal deformations such as adolescent idiopathic scoliosis (Stokes, et al. 2013). Innovative fusionless devices are very promising options as they apply appropriate mechanical forces to correct spinal curves while maintaining growth potential in young patients. Moreover, this minimally invasive approach should avoid intervertebral disc fusion, hence preserving spinal

mobility (Hunt, et al. 2010; Schmid, et al. 2008), as opposed to currently used invasive surgical instrumentations (Aronsson and Stokes 2011). However, compression-based fusionless treatments such as vertebral body staples and tethers connect adjacent vertebral bodies and step across the intervertebral disc in between (Betz, et al. 2010; Campbell and Meyers 2006; Wall, et al. 2005). Instrumented vertebrae and intervertebral discs are therefore submitted to asymmetric compressive loading, which could also cause intervertebral disc degeneration.

It is currently not known whether fusionless treatments correcting the scoliotic spine could alter intervertebral disc integrity in these young patients (Aronsson and Stokes 2011), triggering degeneration in intervertebral discs spanned by fusionless implants either during treatment or after implant removal. To validate the clinical use of fusionless devices, scientific data are required to document potentially adverse short and long-term effects on the intervertebral disc biological integrity and function.

The intervertebral disc is a soft connective tissue composed of a nucleus pulposus (NP) in the center, surrounded by an annulus fibrosis (AF). Its role consists in transmitting mechanical loads between each vertebra level, while allowing movement and flexibility of the spine (Chan, et al. 2011; Lai, et al. 2008). The rat tail model is well-suited to study the effects of mechanical loading on the intervertebral disc as its biological structure mimics the ones in pediatric spines (Ching, et al. 2003; Lai, et al. 2008). Moreover, rat caudal vertebrae and intervertebral discs are easily accessible for surgical manipulations to investigate the mechanobiological responses of both soft and hard tissues. This animal model has essentially been developed to understand intervertebral disc degeneration mechanisms with age (Ching, et al. 2004; Hirata, et al. 2013). Therefore, abundant literature data provide findings on older rats or mice, submitted to different magnitude and frequency loadings (Ching, et al. 2003), some of them well beyond physiological forces (Hirata, et al. 2013; Lotz, et al. 1998). These studies have found alterations in disc metabolism, such as proteoglycan loss and morphological changes such as height reduction. When disc is immobilized, detrimental degenerative effects have also been observed in the disc (Iatridis, et al. 2006; Stokes and Iatridis 2004). However, when loadings remained within physiological ranges, namely from 0.1 to 1.0 MPa and frequencies between 0.01 Hz and 1.0 Hz, gene expression were maintained similarly to unloaded groups (Iatridis, et al. 2006). Some *in vivo* studies have investigated the effects of physiological mechanical compression on skeletally immature rat discs. Stokes et al. (Aronsson and Stokes 2011; Stokes, et al. 2013) showed that intervertebral

disc height was reduced along with an increased stiffness in growing rats submitted to a sustained compression of 0.1MPa. Their study could however not conclude about a potential metabolic-related cause and assumed that reduced mobility due to device implantation could be a major factor responsible for the observed intervertebral disc height reduction (Stokes, et al. 2013).

The objectives of this study were to evaluate the effects of application and subsequent removal of static *versus* dynamic compression within physiological ranges on intervertebral discs geometry and composition using an *in vivo* growing rat-tail model. It was hypothesized that: 1) both static and dynamic compressive loading reduced intervertebral disc height combined with volumetric or compositional (NP *versus* AF) changes only in static compressive loading, and that 2) subsequently removing compression maintained intervertebral disc integrity in dynamic loading while keeping or increasing structure and composition changes in static loading.

5.4 Methods

5.4.1 *In Vivo* Experimental Setup

The study protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee. Forty-eight male Sprague-Dawley rats were divided into two groups (2 weeks and 4 weeks), each containing four subgroups: control (n = 6), sham (n = 6), static (n = 6) and dynamic (n = 6) (Figure 5.1-A through C, Table 5.1). All rats were received at 21 days old and had one-week acclimatization. Rats from 2 weeks groups were euthanized at 43 days old, while rats from 4 weeks groups at 53 days old. Control rats received no surgical treatment. Sham, static and dynamic rats were operated at 28 days old. Sham rats of both 2 and 4 weeks had a micro-loading device implanted but no loading applied. Static rats of 2 weeks group had 15 days of sustained loading at 0.2 MPa before euthanasia. Static rats of 4 weeks group had 15 days of sustained loading at 0.2 MPa followed by 10 days without loading. Similarly to the static subgroup, dynamic rats were loaded at 0.2 MPa +/- 30% at a frequency of 0.1 Hz in 2 weeks group and loading was removed for 10 days in 4 weeks group. Loading duration and rat age were selected according to the rat pubertal growth spurt (Quinn 2005; Sengupta 2013) similarly to other studies on bone growth modulation (Cancel, et al. 2008; Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). Loading level intensity remained within physiological ranges and was enough to reduce without stopping bone growth (Ménard, et al. 2014; Stokes, et al. 2006).

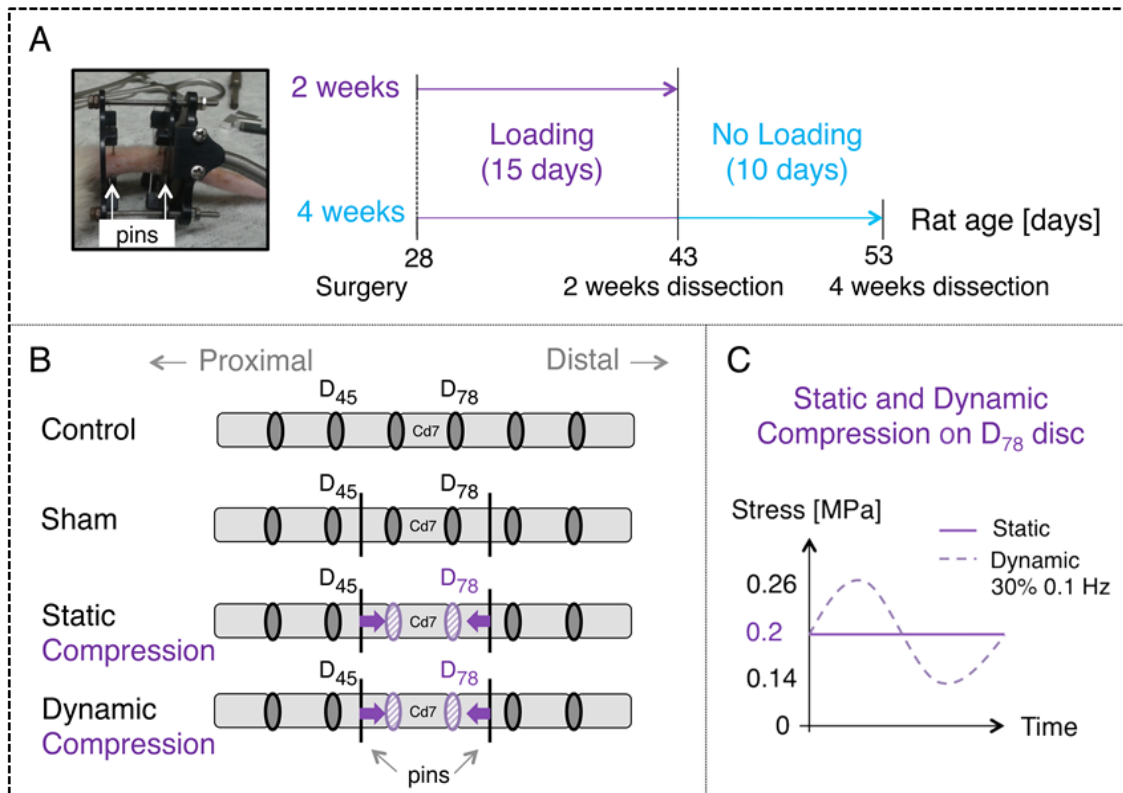


Figure 5.1: Experimental protocol. A: Experimental design and loading device installed on a rat tail. B: Experimental groups. C: Static and dynamic compression protocols.

Table 5.1: Experimental design: number of rats per groups, subgroups, and loading protocol.

	2 weeks group		4 weeks group	
	Number of rats	Loading application (15 days)	Number of rats	Loading application (15 days) + loading removal (10 days)
Control	n = 6	N/A	n = 6	N/A
Sham	n = 6	0 MPa	n = 6	0 MPa + 0 MPa
Static	n = 6	0.2 MPa	n = 6	0.2 MPa + 0 MPa
Dynamic	n = 6	0.2 MPa +/- 30% at 0.1 Hz	n = 6	0.2 MPa +/- 30% at 0.1 Hz + 0 MPa

5.4.2 Compressive Loading Application

The device was implanted on the 6th and 8th caudal vertebrae (Cd6 and Cd8), to load the 7th caudal vertebra (Cd7) and the two adjacent intervertebral discs, referred to as D₆₇ and D₇₈ (Figure 5.1-B). The surgical procedure was similar to other published studies (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011), with a loading device well tolerated by the animals. Compression was transmitted through the inflation and/or deflation of a latex bladder (DipTech Systems Inc, Kent, Ohio) controlled by an air-compressed system, as previously described (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). The micro-compression device was calibrated with a micro-mechanical loading machine (MACH-1, Biomomentum, Laval, QC, Canada; 17N force range and 0.026N resolution) prior to its use *in vivo* to apply a finely controlled force. The force was increased and adjusted daily according to the growth of Cd7 transverse area, modeled as a circular surface (Cancel, et al. 2008).

5.4.3 Tissue Processing

After euthanasia using guillotine on the anesthetized rat, intervertebral discs (D_{45} , D_{78}) were collected. D_{45} was used as an inter-animal control disc, while D_{78} , the distal loaded disc, was analyzed. Intervertebral discs were fixed in formalin (Anachemia, Montréal, QC, Canada), dehydrated, clarified and infiltrated before embedding in methylmetacrylate (MMA) (Fisher Scientific Canada, Nepean, ON, Canada). Due to tissue processing problems, one loaded disc D_{78} in the 2 weeks dynamic group as well as one control disc D_{45} in the 4 weeks dynamic group were removed from the study.

5.4.4 Intervertebral Disc Height

MMA embedded samples (caudal vertebrae and discs) were imaged using a microCT (SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Belgium) with Al 0.5mm filter, a 50 kV source and an image pixel size of 8.74 μm . Tri-dimensional reconstruction (Skyscan N Recon software) was performed in the area of interest, i.e. selection of the distal end of the proximal vertebra (up to the growth plate) and the proximal end of the distal vertebra (up to the growth plate) centered on the disc invisible on X-rays (Figure 5.2-A). Dataset was further transferred to ImageJ (National Institutes of Health) to select six images around the center of both adjacent vertebrae and the intervertebral disc height for D_{45} and D_{78} was calculated using a semi-automated custom-made Matlab program (Ménard, et al. 2014; Valteau, et al. 2011). The program modeled the distal edge of Cd7 as well as the proximal edge of Cd8 as splines and calculated the distance between both splines to estimate disc height (Figure 5.2-A). Moreover, intervertebral disc D_{45} height was used to normalize D_{78} height to correct potential individual growth variability within the same group.

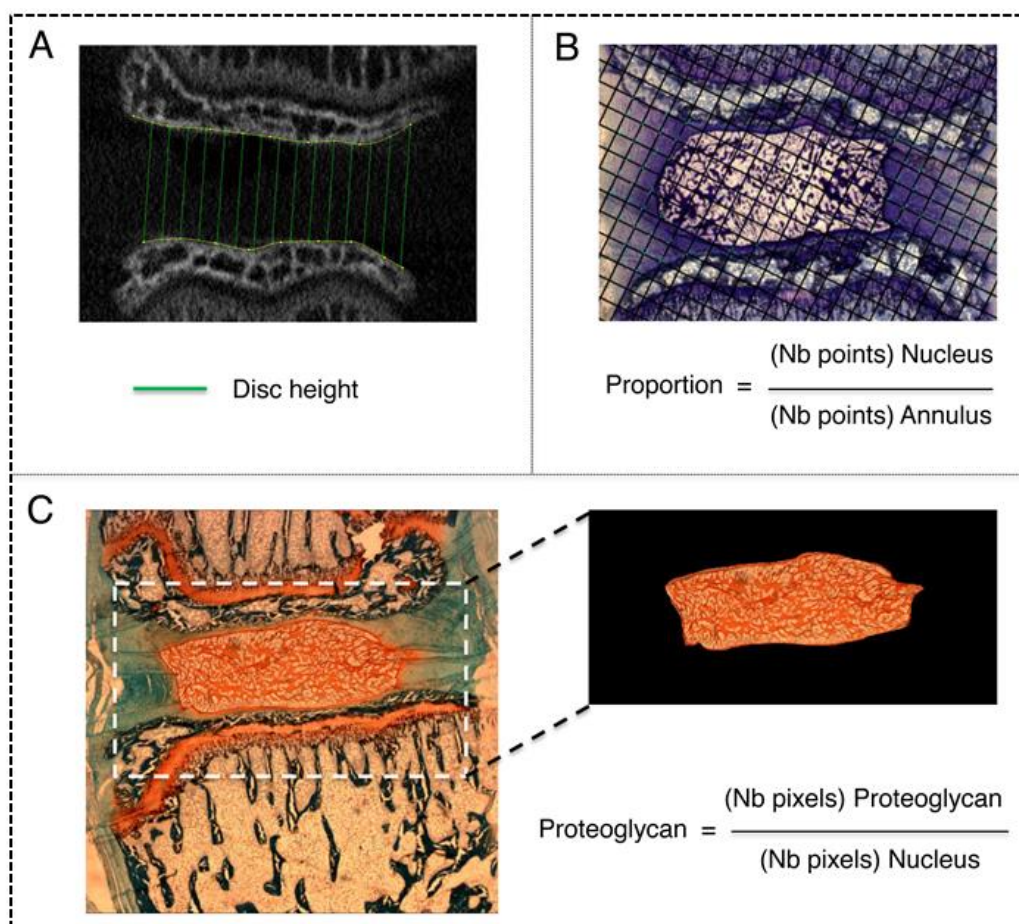


Figure 5.2: Measurement methods. A: Disc height measurements on microCT images showing interpolation and measurements generated by Matlab. B: Point-counting method for measuring nucleus *versus* annulus proportions. C: Measurement of nucleus proteoglycan content on Safranin-O stained images using ImageJ.

5.4.5 Intervertebral Disc Histology

Caudal segment samples, including vertebrae and discs, were cut in 6 μm sections using a microtome (Leica SM2500) in the longitudinal bone axis of the 5th and 7th caudal vertebrae. Slides were organized in series of six slides until disc mid-section was reached. Then, the first mid-section slide was stained with 0.2% toluidine blue and used for nucleus/annulus proportion measurements. The second slide was stained with Safranin-O and Fast-Green for proteoglycan content.

5.4.6 Stereological Analyses – Nucleus Versus Annulus Proportions

Three to six toluidine-blue stained images per disc were analyzed. Images were taken with an optical microscope (Leica DMR with Retiga Qimaging Camera) at 2.5X magnification from selected sections showing maximal nucleus (disc mid-section). Quantification was done using the point counting stereological method (Breur, et al. 1997; Breur, et al. 1991; Hunziker and Schenk 1989b; Hunziker, et al. 1987) using a grid produced on Gimp software, randomly positioned on the images with dimensions insuring sufficient intersection points (i.e. 50 to 300 points) in each tissue (nucleus and annulus). Quantification was done using ImageJ cell counter plugin (Figure 5.2-B).

5.4.7 Proteoglycan Content of the Nucleus

Series around disc mid-section were analyzed. Safranin-O stained images were taken using the optic microscope at 2.5X magnification. The number of red stained pixels was quantified with ImageJ by adjusting saturation and brightness thresholds for each image. Proteoglycan content in the nucleus was calculated as the ratio of the number of red-stained pixels in the nucleus divided by the total number of pixels representing the nucleus (Figure 5.2-C).

5.4.8 Statistical Analyses

One-way ANOVA for repeated measures was performed to identify differences between mean values of each parameter from each rat subgroup, for each intervertebral disc (inter-animal control disc D₄₅, and loaded disc D₇₈) separately for both 2 and 4 weeks groups. All subgroups were further compared using post-hoc Tukey's comparisons with a significance level of $p < 0.05$.

5.5 Results

Rats weighted 88.4g (± 7.2) on the day of surgery (28 d.o.) in 2 weeks groups and 85.3g (± 12.2) in 4 weeks groups. Their weights reached 223.5g (± 18.8) at 43 days old (2w groups) and 317.3g (± 42.6) at 53 days old (4w groups). Significant body weight reduction was reported only between 2 weeks shams compared with controls ($p = 0.019$).

5.5.1 Static and Dynamic Rats Showed Similar Nucleus Proteoglycan Increase at 2 Weeks, But at 4 Weeks it Decreased Among Static and Remained High Among Dynamic Rats

In 2 weeks groups, both static and dynamic showed significantly higher proteoglycan contents compared to shams (Figure 5.3-A and B, Table 5.2). Both loaded subgroups had similar levels compared to controls. However, in 4 weeks groups, following loading removal, the level of proteoglycans of the static subgroup was similar to the sham level, therefore significantly lower than dynamics (Figure 5.3-A and B, Table 5.2). Dynamic proteoglycan content, on the other hand, remained elevated with no statistical differences with controls (Figure 5.3-A and B, Table 5.2).

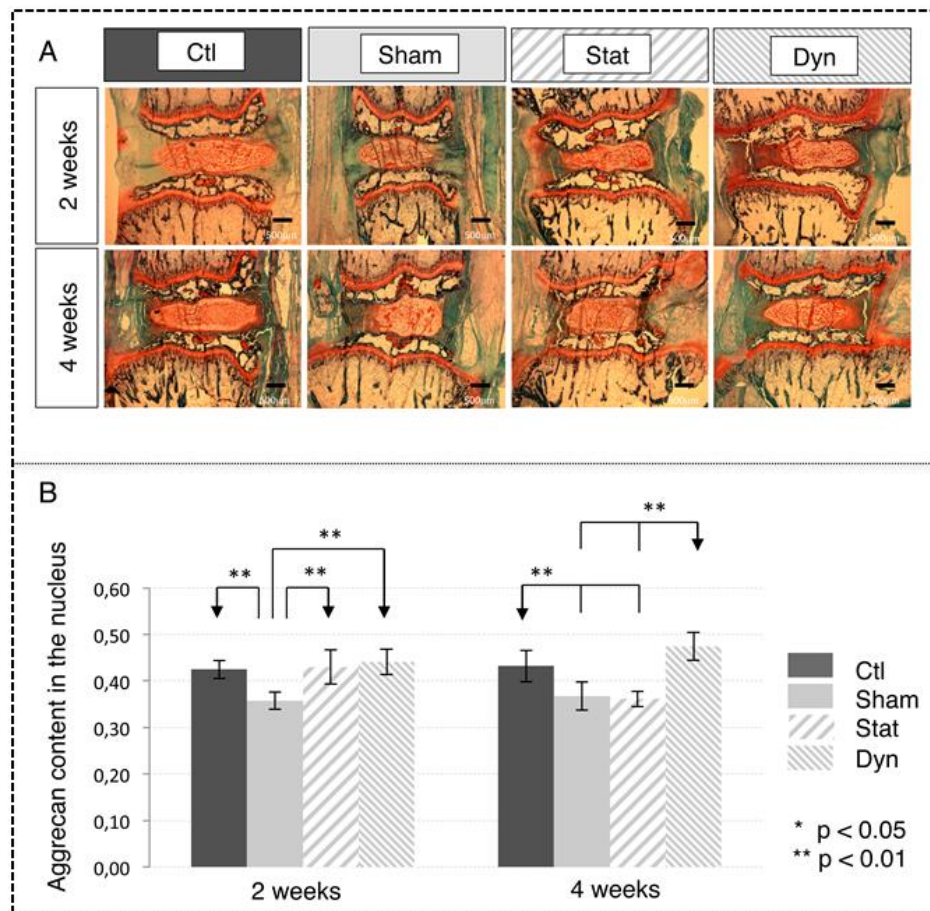


Figure 5.3: Nucleus proteoglycan content. A: Comparison of disc D₇₈ morphology from Safranin-O images (X2.5 magnification) for all groups. B: Nucleus proteoglycan content for loaded discs D₇₈. Arrowheads represent reference groups used for comparisons, with ** p < 0.01.

Table 5.2: Composition of the inter-animal control disc D₄₅ and the loaded disc D₇₈ (mean value \pm SD) with $^{\dagger}p < 0.01$ compared to controls, $^{**}p < 0.01$ compared to shams and $^{##}p < 0.01$ compared to statics. Number of rats per subgroup is n = 6 for all discs of all subgroups except the dynamic one at 2w and 4w groups, where exceptions are indicated as follows: (X₄₅) refers to n = 5 for D₄₅, and (X₇₈) to n = 5 for D₇₈.

Intervertebral discs D ₄₅ and D ₇₈		Nucleus proteoglycan content		Nucleus/Annulus proportion	
		D ₄₅	D ₇₈	D ₄₅	D ₇₈
2 weeks group (43 d.o.)	Control	0.458 \pm 0.039	0.424 \pm 0.019	0.521 \pm 0.086	0.505 \pm 0.082
	Sham	0.414 \pm 0.040	0.357 \pm 0.018 [†]	0.469 \pm 0.076	0.483 \pm 0.034
	Static	0.436 \pm 0.040	0.430 \pm 0.036 ^{**}	0.477 \pm 0.039	0.480 \pm 0.064
	Dynamic (X ₇₈)	0.426 \pm 0.033	0.441 \pm 0.027 ^{**}	0.499 \pm 0.047	0.432 \pm 0.064
4 weeks group (53 d.o.)	Control	0.496 \pm 0.060	0.432 \pm 0.034	0.540 \pm 0.046	0.521 \pm 0.076
	Sham	0.452 \pm 0.038	0.368 \pm 0.031 [†]	0.493 \pm 0.053	0.492 \pm 0.038
	Static	0.464 \pm 0.054	0.361 \pm 0.016 [†]	0.527 \pm 0.027	0.468 \pm 0.038
	Dynamic (X ₄₅)	0.467 \pm 0.045	0.474 \pm 0.030 ^{##}	0.483 \pm 0.047	0.440 \pm 0.074

5.5.2 Static and Dynamic Rats Resulted in Similar Intervertebral Disc Height Reduction in Both 2 and 4 Weeks Groups

Intervertebral disc height ratios of D₇₈/D₄₅ were reduced similarly in both static and dynamic subgroups from 2 and 4 weeks groups (Figure 5.4-A and B). Immediately following loading (2w), the reduction in height ratio was not considered significant, although p values were close to 0.05 when comparing static (p = 0.056) and dynamic rats (p = 0.052) with shams. However, in 4

weeks groups, disc height ratio was significantly lower in both static ($p = 0.011$) and dynamic rats ($p = 0.006$) compared to shams.

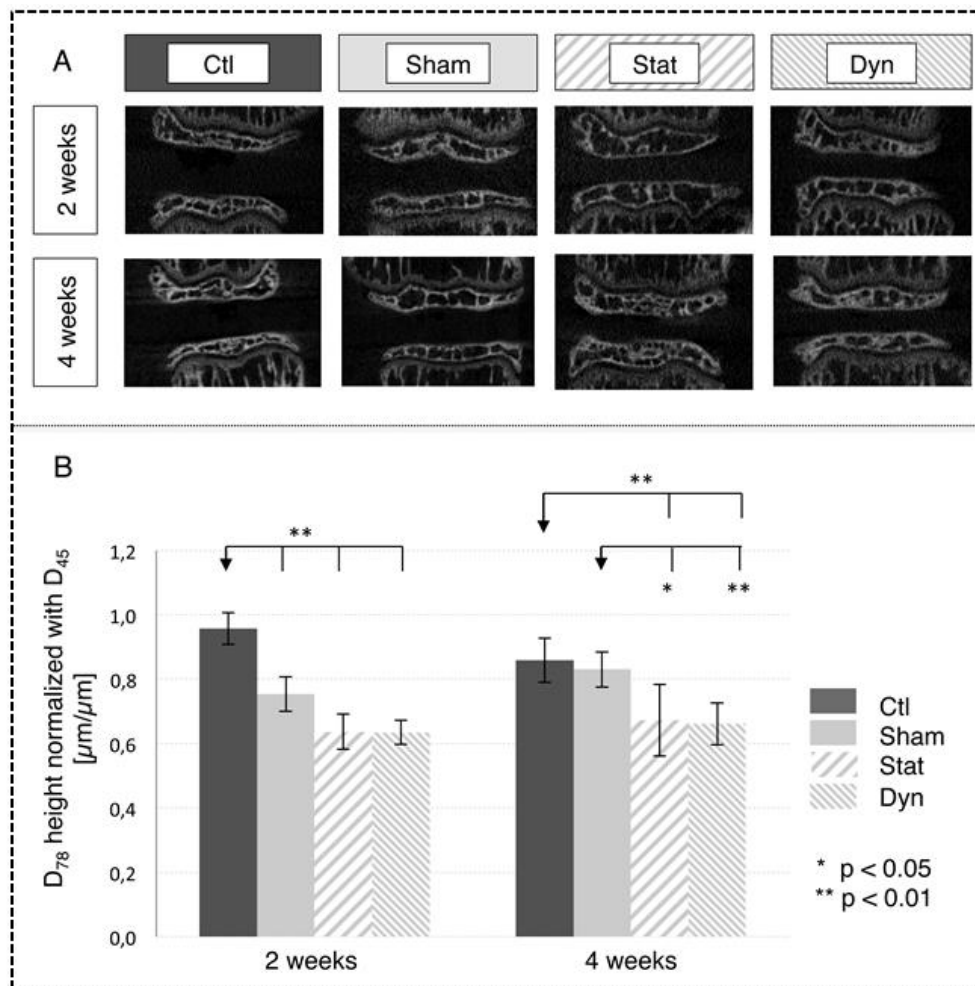


Figure 5.4: Disc height. A: Comparison of disc D_{78} morphology from reconstructed microCT images for all groups (note: discs do not show on microCT images). B: Comparison of intervertebral disc D_{78} height normalized with D_{45} height. Arrowheads represent reference groups used for comparisons, with * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

5.5.3 Static and Dynamic Rats Showed Similar Nucleus Versus Annulus Proportions

Nucleus *versus* annulus proportions did not change neither between groups nor subgroups. They remained around 50% when nucleus is maximal in its mid-section (Table 5.2).

5.5.4 Static and Dynamic Discs had Similar Qualitative Aspects of Their Annulus Fibers

Safranin-O stained sections showed aligned fibers in the annulus and single chondrocytes or chondrocytes in small isogenous groups (clusters of chondrocytes) aligned along the fibers direction in all subgroups of both 2 and 4 weeks groups (Figure 5.3-A). No visible sign of annulus fiber disruption was observed between loaded subgroups, shams and controls in neither 2 nor 4 weeks groups.

5.5.5 A Sham Effect was Observed in Nucleus Proteoglycan Content and in Intervertebral Disc Height at 2 Weeks

When comparing control and sham rats, a sham effect was noted in nucleus proteoglycan content for both 2 and 4 weeks groups, where sham proteoglycan content was significantly reduced compared to controls ($p < 0.01$) (Figure 5.3-B). Moreover, in the 2 weeks groups, intervertebral disc height ratio was significantly lower in shams compared to controls (Figure 5.4-B, Table 5.3). However, intervertebral disc height ratio was restored in shams of the 4 weeks group (Figure 5.4-B, Table 5.3).

Table 5.3: Heights of the inter-animal control disc D₄₅ and the loaded disc D₇₈ (mean value \pm SD) with $^{\dagger}p < 0.05$ and $^{\ddagger}p < 0.01$ compared to controls, and $^*p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ compared to shams.

Group/ Disc heights [μm]	2 weeks group (43 d.o.)		4 weeks group (53 d.o.)	
	D ₄₅	D ₇₈	D ₄₅	D ₇₈
Control (n = 6)	1237.7 \pm 209.9	1184.1 \pm 95.4	1361.3 \pm 145.6	1167.9 \pm 93.5
Sham (n = 6)	1108.6 \pm 132.2	835.2 \pm 91.1 ^{\ddagger}	1245.6 \pm 115.1	1033.9 \pm 67.8 [*]
Static (n = 6)	1250.6 \pm 71.6	796.0 \pm 96.2 ^{\ddagger}	1338.1 \pm 128.4	898.9 \pm 148.6 ^{\ddagger}
Dynamic (n = 6)	1216.7 \pm 195.7	772.3 \pm 68.9 ^{\ddagger}	1205.3 \pm 78.7 ^{\dagger}	796.3 \pm 78.0 ^{\ddagger,**}

5.5.6 Little Differences were Obtained Between Intra-Animal Intervertebral Disc Controls D₄₅

No significant differences were observed in intervertebral control disc D₄₅ composition, namely nucleus/annulus proportion and proteoglycan content of the nucleus (Table 5.2). However, intervertebral disc height was reduced in 4 weeks dynamic subgroup compared to controls (Table 5.3).

5.6 Discussion

This study investigated the effects of applying and removing two compression regimens (static, dynamic) within physiological ranges on the intervertebral disc structure and composition of immature rats. The hypothesis stated that intervertebral disc geometry and composition would be modified following both static and dynamic compressions. However, compression removal would differentiate static and dynamic regimens, with the assumption that dynamic could be a better force loading type for tissues. Our results showed that static and dynamic compression removal lead to differences in nucleus proteoglycan content. Static rats had a significantly

decreased nucleus proteoglycan contents compared to dynamic rats. This could be an early sign of intervertebral disc degeneration (Chan, et al. 2011), suggesting that long-term static (and sham) treatment would be more detrimental to the intervertebral disc compared to dynamic treatment. However, in both static and dynamic subgroups, intervertebral disc height remained lower even after compression removal. It seems therefore that treatments on the intervertebral disc, even within physiological ranges, can cause long-term changes on its structure and composition.

5.6.1 Differences Between Static and Dynamic Compression Became Apparent Following Loading Removal

Proteoglycan content in the nucleus was found similar between static and dynamic rats following compression. A decreased proteoglycan content has previously been observed in the nucleus when static compression was well beyond physiological levels (Hutton, et al. 2000; Iatridis, et al. 2006; Lotz, et al. 1998) and when dynamic frequency was too elevated (Ching, et al. 2004). Iatridis et al. mentioned compressive loading thresholds at 1.0 MPa, and at a frequency below 0.01 Hz or above 1.0 Hz (Iatridis, et al. 2006). We intentionally used low stress levels (0.2 MPa) to remain within physiological ranges; the dynamic frequency of 0.1 Hz used in this study is within the stimulus range showed to maintain intervertebral disc metabolism (Iatridis, et al. 2006). Similar force ranges selected in Iatridis et al. (Iatridis, et al. 1999), resulted in a glycosaminoglycan increase in the intervertebral disc composition after static compression applied *in vivo* on a rat tail model with two loaded discs for up to 56 days. Ching et al. compared *in vivo* static *versus* dynamic compressions at three different frequencies (0.5 Hz, 1.5 Hz, 2.5 Hz) using mature rats for 1h/day for a total duration of 14 days. Their protocol would simulate loading application and removal for several cycles with a removal time interval 24 times higher than loading time. In the study by Ching et al. (Ching, et al. 2004), it was observed that total proteoglycan significantly decreased in static group compared to lowest frequency (0.5 Hz) dynamic group, but when frequency was increased, proteoglycan levels dropped to the static levels. In our study, we used a frequency of 0.1 Hz, which is five times lower than the frequency employed in the study by Ching et al. (Ching, et al. 2004). Indeed, dynamic compression in our study (magnitude of 0.2 MPa combined with 0.1 Hz of low frequency loading) shows proteoglycan increase compared with shams. Our results support the hypothesis of a compression

threshold level in static as well as dynamic compression to maintain proteoglycan content in the nucleus.

Following loading removal, obtained results discriminated static from dynamic loading conditions. Proteoglycan levels decreased in the static subgroup while remaining elevated in the dynamic one. Proteoglycan decrease is one of the early signs of intervertebral disc degeneration as proteoglycans are responsible for nucleus osmotic properties to resist compression (Chan, et al. 2011). Static compression might cause large proteoglycan cleavage or chemical modifications of their G1 domain which affect the integrity and turnover of intervertebral disc proteoglycans as reported in older subjects by non-enzymatic glycation (Roughley, et al. 2014). Maintaining static compressive stress might force proteoglycans to remain within the nucleus, therefore limiting their loss. When loading is removed, modified and smaller size proteoglycans could migrate out of the nucleus (Jafari, et al. 2015). In the dynamic case, proteoglycan levels remained unchanged after loading removal, suggesting that proteoglycans integrity is preserved, similarly to the one in controls. Identical proteoglycan content might as well mean higher turnover and metabolism combining proteoglycan loss and upregulation of proteoglycan production (Iatridis, et al. 2006). Dynamic loading with appropriate magnitude and frequency could reproduce physiological conditions and enable fluid movements through the structure, which might contribute to maintaining the overall structural balance. Further studies would be required to investigate and analyze the different proteoglycan types in order to understand pathways of proteoglycan transformations when submitted to different physiological loading types.

5.6.2 Static and Dynamic Intervertebral Disc Height Remained Reduced Even After Loading Removal

Intervertebral disc height reduction following compressive loading is well documented in the literature, in immature animals as well (Stokes, et al. 1998). In normal healthy intervertebral discs, diurnal variations of intervertebral disc height are observed depending on compression magnitude related to daily activity and position. However, in our study, height was not restored following loading removal, with a possible explanation associated with our experimental design. Fixations and rods were maintained in place after compression removal to support the structural device. Although rods were kept loose to minimize their effect and ensure no added compression, this setup could have added rigidity to the structure. This setup group could be seen as an

intermediate case between shams found in the literature instrumented with fixations only, and immobilized groups with both fixations and rods (Iatridis, et al. 1999). Immobilization was found to cause significant changes on intervertebral disc geometry, especially its height (Iatridis, et al. 1999; Stokes and Iatridis 2004). Therefore, our sham effect might be a result of partial immobilization, reduced motion and increased segment rigidity. Moreover as no significant differences were found between shams, static and dynamic loading removal, device design might be the origin of remaining intervertebral disc reduction compared to controls.

5.6.3 Sham Effect and Limitations are Associated to the Used Rat Model

Apart from intervertebral disc height at 2 weeks, a sham effect was also observed in terms of proteoglycan content in both 2 and 4 weeks groups. Sham effects were previously reported in the literature, and explained by device implantation and procedure that cause added stress (Iatridis, et al. 1999; Stokes and Iatridis 2004). As aforementioned, our sham group is similar to a partially immobilized group. Consequently, slow proteoglycan turnover and fluid movements could explain the reduction of intervertebral disc proteoglycans.

Other limitations of this study include nucleus cell phenotype differences between rats and humans. In rats, notochordal cells in the nucleus are found in a higher proportion compared to humans, where chondrocyte-type cells prevail. Notochordal cells accelerate intervertebral disc remodeling and recovery (Stokes, et al. 2013; Wuertz, et al. 2009). Therefore, rat intervertebral disc results are optimistic for knowledge transfer to humans. Human intervertebral discs should have lower metabolic rate and different mechanically induced remodeling thresholds. Another limitation includes loading removal duration chosen at 10 days to enable intervertebral disc cell recovery. More substantial changes might have been observed with a longer duration of loading removal. Monitoring weekly *in vivo* changes on the intervertebral disc would have required other technologies or added greater amount of animals to the study.

5.6.4 Conclusion

Results from this study support a better preservation of intervertebral disc structure in response to dynamic compression. Following loading removal, proteoglycans levels decreased in the static group while remaining elevated in the dynamic group. Careful control in both static and dynamic compressions is critical to maintain proteoglycan content in the nucleus. Investigating

intervertebral disc responses following compression is essential to gain knowledge to prevent possible adverse effects of fusionless implants on intervertebral discs composing immature spines. Thus, optimized solutions have to be elaborated to preserve intervertebral disc integrity that could be compromised in many clinical situations including in young patients undergoing surgery.

5.7 Acknowledgements

The authors would like to warmly thank laboratory team members, Souad Rhalmi, Charlotte Zaouter, Saadallah Bouhanik, all the animal care technicians for their precious contributions and technical advices. This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (I.V.), the Canada Research Chair in Mechanobiology of the Pediatric Musculoskeletal System (I.V.), as well as the NSERC/CREATE program (ALM) and the Network for Oral and Bone Health Research (RSBO) (ALM). G. Grimard is a consultant and owns stock options at Emovi, Inc.

5.8 References

Aronsson, D. D., and I. A. Stokes

2011 Nonfusion treatment of adolescent idiopathic scoliosis by growth modulation and remodeling. *J Pediatr Orthop B*.

Betz, R. R., et al.

2010 Vertebral body stapling: a fusionless treatment option for a growing child with moderate idiopathic scoliosis. *Spine* 35(2):169-76.

Breur, G. J., et al.

1997 The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates. *Calcif Tissue Int* 61(5):418-25.

Breur, G. J., et al.

1991 Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res* 9(3):348-59.

Cancel, M., et al.

2009 Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix. *Bone* 44(2):306-15.

Chan, W. C. W., et al.

2011 Structure and Biology of the Intervertebral Disk in Health and Disease. *Orthop Clin North Am* 42:447-464.

Ching, C. , et al.

2004 Changes in nuclear composition following cyclic compression of the intervertebral disc in an in vivo rat-tail model. *Med Eng Phys* 26:587-594.

Ching, C., et al.

2003 The effect of cyclic compression on the mechanical properties of the intervertebral disc: An in vivo study in a rat tail model. *Clinical Biomechanics* 18:182-189.

Hirata, H., et al.

2013 A Rat Tail Temporary Static Compression Model Reproduces Different Stages of Intervertebral Disc Degeneration with Decreased Notochordal Cell Phenotype. *Journal of Orthopaedic Research*:455-463.

Hunt, K. J., J. T. Braun, and B. A. Christensen

2010 The Effect of Two Clinically Relevant Fusionless Scoliosis Implant Strategies on the Health of the Intervertebral Disc. *Spine* 35(4):371-377.

Hunziker, E. B., and R. K. Schenk

1989 Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol* 414:55-71.

Hunziker, E. B., R. K. Schenk, and L. M. Cruz-Orive

1987 Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 69(2):162-73.

Hutton, W. C., et al.

2000 Does Long-Term Compressive Loading on the Intervertebral Disc Cause Degeneration? spine 25(23):2993-3004.

Iatridis, J. C., et al.

2006 Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism in vivo. J Bone Joint Surg Am 88 Suppl 2:41-46.

Iatridis, J. C., et al.

1999 Compression-Induced Changes in Intervertebral Disc Properties in a Rat Tail Model. Spine 24:996-1002.

Lai, A., et al.

2008 Effects of Static Compression With Different Loading Magnitudes and Durations on the Intervertebral Disc: An In Vivo Rat-Tail Study. Spine 33(25):2721-2727.

Lotz, Jeffrey C., et al.

1998 Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study. Spine 23(23):2493-2506.

Ménard, A-L., et al.

2014 In Vivo Dynamic Loading Reduces Bone Growth Without Histomorphometric Changes of the Growth Plate. Journal of Orthopaedic Research.

Quinn, R.

2005 Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? . Nutrition:775-777.

Roughley, P. J., Y. Geng, and J. S. Mort

2014 The non-aggregated aggrecan in the human intervertebral disc can arise by a non-proteolytic mechanism. European Cells and Materials 28:129-136.

Schmid, E. C., et al.

2008 A novel fusionless vertebral physcal device inducing spinal growth modulation for the correction of spinal deformities. Eur Spine J.

Sengupta, P.

2013 The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*:624-630.

Sivan, S. S., E. Wachtel, and P. J. Roughley

2014 Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochimica et biophysica acta*:3181-3189.

Skaggs, D. L., et al.

2013 A classification of growth friendly spine implants. *J Pediatr Orthop*

Stokes, I. A., et al.

2006 Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. *Journal of orthopaedic research* 24(6):1327-34.

Stokes, I. A., et al.

1998 Mechanical Modulation of Intervertebral Disc Thickness in Growing Rat Tails. *Journal of Spinal Disorders* 11(3):261-265.

Stokes, I. A., and J. C. Iatridis

2004 Mechanical Conditions That Accelerate Intervertebral Disc Degeneration: Overload Versus Immobilization. *Spine* 29(23):2724-2732.

Stokes, I. A., et al.

2013 Metabolic Effects of Angulation, Compression, and Reduced Mobility on Annulus Fibrosis in a Model of Altered Mechanical Environment in Scoliosis. *Spine Deform.*:161-170.

Valteau, B., et al.

2011 In vivo dynamic bone growth modulation is less detrimental but as effective as static growth modulation. *Bone*.

Wall, E. J., et al.

2005 Endoscopic mechanical spinal hemiepiphysiodesis modifies spine growth. Spine 30(10):1148-53.

Wuertz, K., et al.

2009 In Vivo Remodeling of Intervertebral Discs in Response to Short- and Long-Term Dynamic Compression. Journal of Orthopaedic Research:1235-1242.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette discussion reprend les points clés des items présentés dans chaque article scientifique et ajoute un complément à ces points.

6.1 Conditions de compressions dynamiques

Le type de chargement, la magnitude et la durée d'application influencent la croissance et l'histomorphométrie de la plaque de croissance (Ohashi, et al. 2002; Robling, et al. 2001; Stokes, et al. 2005a). L'étude de Valteau et coll. a montré qu'avec une même contrainte moyenne le chargement dynamique était tout aussi efficace en termes de modulation de croissance que le chargement statique, tout en préservant l'intégrité de la plaque de croissance (Valteau, et al. 2011). Le mode de compression dynamique semble donc posséder un potentiel intéressant pour de futures applications. C'est pourquoi le choix s'est porté sur l'investigation des effets de différents profils de compression dynamique avec des contraintes moyennes identiques, sur la croissance et l'histomorphométrie de la plaque de croissance (Article scientifique 1). Le premier objectif spécifique de cette thèse était d'investiguer différentes combinaisons de chargement dynamique à savoir la fréquence et l'amplitude. Les résultats obtenus ont permis d'identifier les conclusions suivantes :

- ✓ La modulation de croissance est contrôlée en partie par la contrainte moyenne;
- ✓ L'augmentation de fréquence ou d'amplitude a des effets semblables sur l'histomorphométrie de la plaque de croissance;
- ✓ Il existe des plages de valeurs (amplitude, fréquence) à ne pas dépasser pour éviter d'endommager les tissus.

Des points additionnels sont discutés ci-dessous.

6.1.1 Choix des conditions de chargement dynamique

Dans le premier article, le chargement dynamique de référence était une compression de valeur moyenne de 0.2 MPa avec une amplitude de 30% (plages de variation de 0.14 MPa à 0.26 MPa) et une fréquence de 0.1 Hz. Ce niveau de contrainte de 0.2 MPa correspond à une position assise chez l'humain (MacLean, et al. 2005). Lorsqu'appliqué en continu, cette contrainte permet de

ralentir la croissance tout en restant loin des valeurs de 0.5-0.6 MPa causant un arrêt complet de croissance (Villemure and Stokes 2009a). Ce cas de chargement a été implémenté par l'étude de Valteau et coll. (Valteau, et al. 2011) et comparé au chargement statique à 0.2 MPa, pendant la même durée (15 jours) avec des rats du même âge et avec un dispositif de chargement semblable à celui utilisé dans cette étude. Ce groupe de référence n'a pas été reproduit dans l'étude mais les augmentations d'amplitude (100% *versus* 30%) et de fréquence (1.0 Hz *versus* 0.1 Hz) se réfèrent à ce groupe. Par ailleurs, les mesures ont été soigneusement réalisées avec les mêmes décisions scientifiques en termes du choix des mesures, du nombre de mesures, de l'espacement des lames, et de la méthodologie de mesure afin de limiter les erreurs causées par le changement d'utilisateur et pouvoir ainsi comparer le plus objectivement possible les résultats obtenus. L'augmentation d'amplitude à 100% permettait d'approcher une valeur de contrainte (0.4 MPa) proche de l'arrêt de croissance, et en réalisant une condition éloignée du 30% afin de dissocier les deux groupes et leurs effets respectifs. De plus, l'augmentation de fréquence à 1.0 Hz correspond à une fréquence de course ou de marche olympique (plus de 13km/h). La plage de variation pour de la marche se situe entre les deux fréquences testées.

6.1.2 Seuils d'adaptation

Nos résultats ont montré que la plaque de croissance peut tolérer et s'adapter à un certain niveau de compression, en minimisant les altérations structurelles et fonctionnelles, ce qui rejoint l'idée d'Iatridis et coll. résumant les résultats d'études sur le disque intervertébral (Iatridis, et al. 2006). Il mentionne des plages de compression stimulantes avec des valeurs de compression de 0.2 MPa ou au contraire dommageables pour le disque intervertébral pour des compressions supérieures à 1.0 MPa, ainsi que des fréquences soit inférieures à 0.01 Hz soit supérieures à 1.0 Hz (Iatridis, et al. 2006). Ainsi, la combinaison de conditions de compression trop éloignées de chargements physiologiques dans une durée trop faible ou limitée conduit à des dommages irréversibles sur la plaque de croissance, et ne permet pas au tissu d'y répondre en s'adaptant en conséquence. Il s'agit du résultat observé dans le troisième groupe chargé dynamiquement (à 0.2 MPa) avec une amplitude de 100% variant entre 0 et 0.4 MPa, à une fréquence de 1.0 Hz. Les infections à répétition observées dans les animaux de ce dernier groupe cumulant augmentation abrupte d'amplitude et de fréquence pourraient aussi résulter d'un échauffement thermique des tissus au-delà de leur résistance à la fatigue, entraînant par la suite leurs destructions. Aussi, pour que les

tissus répondent mieux aux charges élevées, il est nécessaire de leur fournir le temps de s'y adapter (en réduisant la fréquence initialement par exemple) et de les conditionner avec un programme progressif. La détermination de ces seuils et le potentiel du tissu à y répondre et s'y adapter requièrent davantage d'investigation expérimentale, en biomécanique cellulaire par exemple, qui pourrait être complétée par des modèles par éléments finis. Ces études complémentaires permettraient de mieux comprendre et prévoir le comportement mécanique de la plaque de croissance en variant les profils de chargement et les durées d'application de ces charges, afin de construire des programmes de conditionnement tissulaire aux stimuli mécaniques.

6.1.3 Niveau et durée ou historique de compression

Dans la présente étude, une seule contrainte moyenne a été sélectionnée et fixée à 0.2 MPa, ce qui correspond à une compression physiologique modérée, appliquée sur le rachis humain en position assise (MacLean, et al. 2005). À cause de la viscoélasticité de la plaque de croissance, la contrainte moyenne n'est pas le seul paramètre à prendre en compte dans l'analyse de la réponse de la plaque de croissance à la compression; il est aussi important de considérer la durée ou l'historique de compression. En effet, appliquer cette compression à temps plein pendant 15 jours ne constitue pas une configuration physiologique, tel que rappelé par Stokes et coll. (Stokes, et al. 2005b). Afin qu'un chargement soit considéré comme physiologique, il aurait pu être envisagé de l'appliquer seulement quelques heures par jour, à la suite ou par intermittence, pour simuler les périodes d'activités et de repos des patients. Stokes et coll. ont investigué des chargements statiques (de 0.1 MPa) sur des vertèbres et des tibias de rats à temps plein *versus* 12h/jour de jour ou de nuit (Stokes, et al. 2005b). Le taux de croissance de la vertèbre chargée était exprimé en pourcentage de la vertèbre contrôle intra-animal. Ils ont trouvé 100% de taux de croissance pour les shams (aucune réduction), 82% de taux de croissance pour la compression à temps plein (réduction de 18%), 93% pour ceux chargés en journée (réduction de 7%) et 90% pour ceux chargés la nuit (réduction de 10%) (Stokes, et al. 2005b). La réduction de taux de croissance dépend donc de la durée avec une réduction moins prononcée lorsque la durée de compression est diminuée. La réduction de croissance était associée à une diminution du nombre de chondrocytes en prolifération ainsi qu'une diminution de la hauteur des chondrocytes hypertrophiques (Stokes, et al. 2005b).

6.2 Reprise de croissance et minéralisation

Suite au traitement clinique et à la rectification des déformations par des implants à modulation de croissance ainsi qu'au retrait subséquent des implants, il est nécessaire de s'assurer que les patients conservent leur potentiel de croissance afin qu'ils puissent poursuivre leur croissance normalement. Pour ce faire, les tissus doivent avoir conservé leur intégrité et leur fonction biologique (Article scientifique 2). Le second objectif spécifique consistait à investiguer l'application suivie du retrait subséquent de compression sur la fonction et la structure histomorphométrique de la plaque de croissance. Les résultats ont montré les points suivants :

- ✓ Les compressions statique et dynamique, avec une contrainte moyenne identique, entraînent une modulation de croissance identique;
- ✓ Les histomorphométries de la plaque de croissance sont semblables, avant et après retrait de chargement statique et dynamique;
- ✓ La minéralisation est augmentée suite au retrait de chargement dynamique.

Des points additionnels sont discutés ci-dessous.

6.2.1 Effet sham

Le nouvel appareil conçu a une masse de 13g, donc similaire à celui de Valteau (environ 15g) utilisé pour l'étude préliminaire et bien inférieur à celui de Cancel (21g). Valteau et coll. n'avait pas observé d'effet sham significatif (Valteau, et al. 2011). Cependant comparé à Valteau, le nouvel appareil de ce projet a des dimensions plus importantes ce qui devrait avoir davantage d'impact sur des animaux plus jeunes et petits, i.e. à 2 semaines par rapport aux animaux de 4 semaines. Or, les résultats de notre étude ne démontrent aucun effet sham à 2 semaines, mais un effet sham après 4 semaines. Par conséquent, il est suggéré qu'une durée de 2 semaines n'a pas été suffisamment longue pour faire apparaître l'effet sham. On pourrait donc conclure que cet effet sham est réel et nuisible, causé par la seule présence de l'appareil qui rigidifie les segments instrumentés. Cet effet sham s'est manifesté par une croissance diminuée sur du plus long terme (durée d'au moins 4 semaines).

6.2.2 Reprise de croissance : effet de la durée de la période de retrait de chargement

Une période de retrait de compression de 10 jours a été choisie, pour permettre aux chondrocytes de réaliser un cycle cellulaire complet de la zone de réserve à la zone hypertrophique, et ce, entre la fin de la compression et la première injection de calcéine (soit 5 jours avant euthanasie). D'après Wilsman et coll., la durée du cycle cellulaire dans la zone proliférative chez un jeune rat de 28 jours est d'environ 30h (Wilsman, et al. 1996a). D'après Hunziker et coll., la durée d'hypertrophie reste constante indépendamment de l'âge ou du taux de croissance et dure autour de 48h chez le rat (Hunziker and Schenk 1989a). Augmenter la durée de retrait aurait pu permettre d'accentuer davantage la reprise de croissance par surcompensation. Ce phénomène de reprise de croissance a été décrit dans la littérature (Boersma and Wit 1997; Emons, et al. 2005; Lui, et al. 2011; Ola Nilsson 2005) et ce, suite au retrait de conditions temporaires empêchant la croissance telles que l'hypothyroïdisme *in vivo* avec des rats (Marino, et al. 2008) ou encore l'injection de glucocorticoïde *in vivo* sur des lapins (Gafni 2001). La surcompensation est expliquée par une sénescence retardée de la plaque de croissance, en supposant que les chondrocytes aient un nombre de division cellulaire prédéterminé (Emons, et al. 2005). Cependant, la reprise de croissance suite à un ralentissement mécanique de la croissance dépendrait à la fois du ratio entre durée d'application et durée de retrait de chargement mais également de la période de croissance active des cellules où l'horloge biologique reprendrait ses droits, conduisant ainsi à des reprises de croissance incomplètes tel qu'indiquées dans la littérature (Boersma and Wit 1997). La reprise de croissance est donc à nuancer en fonction des conditions appliquées qui restent à déterminer.

6.2.3 Minéralisation

Depuis 1971, il est reconnu que la compression dynamique favorise le remodelage osseux et améliore l'architecture et la densité osseuse (Stokes, et al. 2006; Turner 1998), ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans notre étude. Ces résultats de minéralisation ont été mesurés par l'accumulation de calcium au niveau de la zone de calcification provisionnelle, c'est à dire au début du processus de minéralisation lors du dépôt d'hydroxyapatite sur les fibres de collagène de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, une hausse de minéralisation a également été observée dans la vertèbre caudale contrôle Cd5. Afin de vérifier et valider si cette augmentation touche

l'ensemble des vertèbres, il aurait été intéressant de regarder les intensités de calcification sur d'autres vertèbres contrôles proximement (Cd4) et distalement (Cd9) par rapport au dispositif de micro-chargement. De plus, les processus subséquents de formation osseuse impliquant les unités fonctionnelles de l'os n'ont pas été traités. Dans le cas des patients en croissance, l'application de compression implique un double effet sur la croissance osseuse ainsi que sur le remodelage osseux.

6.3 Géométrie et intégrité du disque intervertébral

L'environnement mécanique est un facteur causatif de la dégénérescence discale. L'utilisation d'implants cliniques appliquant de la compression sur les jonctions intervertébrales comporte des risques de compromettre l'intégrité des disques intervertébraux. Il convient donc d'étudier les effets de ces implants à modulation de croissance afin de vérifier la santé du disque intervertébral (Article scientifique 3). Le troisième objectif spécifique concernait l'investigation de l'effet du retrait de compression sur le disque intervertébral. Les résultats ont permis d'établir que :

- ✓ L'application et le retrait des compressions statique et dynamique entraînent une réduction semblable de la hauteur du disque intervertébral;
- ✓ La proportion noyau/anneau ne varie pas entre les groupes ni avant ou après retrait de chargement et est égale à 50% au niveau du noyau maximal;
- ✓ Les compressions statique et dynamique ont un contenu en protéoglycanes augmenté dans le noyau. Par contre, le retrait de compression montre que le contenu en protéoglycanes du noyau diminue pour le groupe statique, alors qu'il reste élevé pour le groupe dynamique.

Des points additionnels sont discutés ci-dessous.

6.3.1 Réduction de hauteur discale et effet sham

Le port de l'appareil sans ajout de chargement par les animaux a réduit la hauteur du disque intervertébral en comparant les groupes à 2 semaines. Ces résultats sont semblables à ceux de la littérature qui ont trouvé que deux conditions extrêmes, l'immobilisation et la compression, conduisaient à des réductions de hauteur discale (Iatridis, et al. 1999; Stokes and Iatridis 2004). Dans notre étude, le groupe sham était un intermédiaire entre le sham et le groupe immobilisé de l'étude de Iatridis et coll. (Iatridis, et al. 1999), car il portait les fixations et les tiges (non serrées).

Par conséquent, l'effet sham de notre étude était causé par une immobilisation partielle plutôt que par l'effet de l'implantation comme telle. À 4 semaines, notre groupe sham a retrouvé une hauteur discale comparable au contrôle.

6.3.2 Réduction de hauteur discale et compression à temps plein

Les hauteurs des disques des groupes statique et dynamique étaient réduites de façon équivalente à 2 semaines et 4 semaines après retrait de chargement. Des résultats identiques ont été observés par Lai et coll. suite à l'application de chargement à temps plein pendant 14 jours sur des rats matures (Lai, et al. 2008). En effet, Lai et coll. ont mesuré les hauteurs des disques sur des rats matures suite à deux niveaux de compression statique (11N et 17N) et deux durées d'application quotidiennes différentes (1h/jour, 24h/jour), et ce pendant 14 jours suivis de 21 jours de retrait de chargement. Les réductions de hauteur sont demeurées dans les groupes chargés pendant 24h, alors que les hauteurs avaient des valeurs semblables aux shams après retrait de chargement d'1h/jour (Lai, et al. 2008). Un chargement à temps plein (24h) serait donc trop important pour permettre au disque intervertébral de retrouver éventuellement sa hauteur d'origine.

6.3.3 Protéoglycanes dans le noyau du disque

Nos résultats penchent en faveur du chargement dynamique qui montre un taux élevé de protéoglycanes dans le noyau même après retrait de compression. Le type de chargement affecte donc le résultat macroscopique de protéoglycanes. La compression dynamique semble maintenir la sécrétion de protéoglycanes intacts alors que la compression statique empêche, modifie ou crée un déséquilibre dans la synthèse de nouvelles protéoglycanes pour remplacer celles qui sont clivées. L'étude de Hutton et coll. sur des chiens observe également une réduction de protéoglycanes du noyau des disques soumis à une compression statique pendant un an (Hutton, et al. 2000). Il serait donc peu probable que les pertes de protéoglycanes suite au retrait de compression statique soient réversibles sur du plus long terme.

6.4 Limitations générales des études

En plus des limitations décrites dans les trois articles scientifiques et celles mentionnées ci-dessus, on peut énoncer les limites générales suivantes :

6.4.1 Protocole expérimental *in vivo*

Les expériences *in vivo* sont sujettes à des limitations intrinsèques pour des raisons de nature différente : chirurgie et manipulations quotidiennes, ainsi qu’alignement et destruction des tissus.

En premier lieu, l’implantation de l’appareil de compression a eu pour effet indésirable de créer des scolioses légères observées sur quelques animaux après plusieurs jours, y compris chez les shams. Ces courbures étaient initiées lorsque les fixations n’étaient pas parfaitement parallèles au moment de la chirurgie. Les réglages quotidiens de l’appareil ont parfois accentué les petites déformations locales.

En second lieu, parmi les techniques expérimentales utilisées, les coupes au microtome peuvent poser différents problèmes d’alignement et de destruction permanente des tissus. Les blocs de tissus comprenaient au moins une vertèbre complète centrale et un disque intervertébral (cf. Annexe A). Il a donc été choisi d’aligner le bloc à couper par rapport au plan de la vertèbre centrale utilisée pour les analyses de croissance. Cependant, l’alignement n’était pas aussi rigoureux lorsque des petites déformations scoliotiques étaient présentes (cf. point susmentionné), ce qui a affecté l’alignement des disques intervertébraux en particulier le disque D₆₇. C’est pourquoi, ce dernier n’a pas été traité dans les résultats. Le positionnement du tissu à couper est donc un paramètre important afin de ne pas manquer le tissu et commencer à récupérer les coupes trop tard. De plus, par définition, les méthodes histologiques de coupes sont destructives. Ces dernières nécessitaient donc le sacrifice des animaux, ce qui empêchait le suivi d’une même cohorte d’animaux à 2 et 4 semaines. Ce suivi sur une même cohorte aurait requis des techniques d’imagerie *in vivo* non invasives, mais les techniques actuelles ne permettent pas d’imager l’histologie des tissus sans les détruire.

6.4.2 Choix du modèle de la queue de rat

Le modèle de la queue de rat est intéressant et avantageux car il permet de contrôler les conditions externes expérimentales en étudiant les réponses biologiques des tissus (MacLean, et al. 2003; MacLean, et al. 2005). Une limitation majeure dans les cas de chargement, concerne sa quadrupédie par rapport à l’homme bipède, ainsi que la petite taille des rongeurs (MacLean, et al. 2005). Les études sur le rat sont donc les premières étapes pour valider ou tester des hypothèses de recherche fondamentale. L’utilisation clinique, dans les cas d’implants pour la scoliose, et la

transposition à l'humain nécessite au moins une seconde étude *in vivo* avec des animaux plus volumineux (chèvre, porc, bœuf, mouton, chien) qui ont des tissus de dimensions plus proches de celles des hommes. Encore une fois, ces animaux sont quadrupèdes et les chargements appliqués doivent être adaptés en conséquence.

6.4.3 Conditions pathologiques

Ce projet s'est intéressé à l'application de chargement dans le cas d'une croissance normale hors condition pathologique supplémentaire. Cependant, des maladies génétiques entraînent des anomalies de croissance et ces conditions pathologiques pourraient influencer les réponses cellulaires aux stimuli mécaniques extérieurs, par exemple si elles touchent la mécanotransduction, le système hormonal ou l'expression d'une protéine.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'objectif principal de ce projet consistait à appliquer *in vivo*, avec le modèle du rat, une modulation de croissance osseuse contrôlée et de vérifier si l'intégrité tissulaire et fonctionnelle de la plaque de croissance et du disque intervertébral était préservée suite à l'application suivie du retrait de différents profils de compressions statique et dynamique. Le protocole expérimental a combiné plusieurs séries d'animaux ainsi que de nouvelles méthodes d'analyse afin de répondre aux trois questions de recherche posées et de remplir les trois objectifs spécifiques définis dans le cadre de cette thèse.

Une première série expérimentale a permis d'investiguer différentes combinaisons de compressions dynamiques sinusoïdales en augmentant la fréquence et/ou l'amplitude, dont les caractéristiques (contrainte moyenne, valeurs numériques) ont été sélectionnées basé sur des travaux antérieurs et la littérature. Les taux de croissance et l'histomorphométrie de la plaque de croissance, dont la hauteur totale de la plaque de croissance et des différentes zones, la densité linéaire de la zone proliférative, la hauteur des chondrocytes hypertrophique, ont été mesurés et comparés entre les groupes. Les résultats de cette étude ont montré que l'augmentation isolée de la fréquence ou bien de l'amplitude conduisait à des modulations de croissance et une histomorphométrie de plaque de croissance semblable. Par contre, l'augmentation combinée de fréquence et d'amplitude a entraîné des infections à répétition sur les animaux. Ce résultat pourrait être attribué à une augmentation de la contrainte moyenne ressentie, donc à des conditions de chargement non équivalentes en termes de contrainte moyenne, qui aurait nui à l'intégrité biologique des tissus. La première question de recherche a donc été traitée. Suite aux résultats de cette étude, la modulation de croissance semble être contrôlée en partie par la contrainte moyenne jusqu'à une limite maximale de combinaison d'amplitudes et de fréquences. Au-delà de ces valeurs, le tissu serait endommagé de façon permanente au point d'empêcher son fonctionnement.

Dans un second temps, une nouvelle série expérimentale a été effectuée afin d'obtenir le matériel nécessaire pour répondre aux questions de recherche 2 et 3. Le protocole comprenait deux groupes de rats, un groupe de 2 semaines et un groupe de 4 semaines. Ces groupes ont permis de comparer les effets de l'application d'une compression statique et dynamique (2 semaines), et de l'application suivie du retrait d'une compression statique et dynamique (4 semaines). D'une part,

les taux de croissance, l'histomorphométrie et la minéralisation de la plaque de croissance ont été mesurés tel que décrit dans l'objectif spécifique 2 et ce, pour répondre à la question de recherche 2. D'autre part, la structure et la composition du disque intervertébral ont été quantifiés et comparés afin de compléter l'objectif spécifique 3 et répondre à la question de recherche 3. Concernant l'objectif spécifique 2, les résultats des taux de croissance des vertèbres ont montré que les compressions statique et dynamique réduisaient le taux de croissance similairement et qu'elles permettaient aussi une reprise de croissance similaire. Par ailleurs, les paramètres histomorphométriques ne différaient pas entre compressions statique et dynamique. De plus, avec les méthodes utilisées dans ce projet, aucune différence au niveau de la minéralisation n'a été observée directement suite à une compression statique ou dynamique. Par contre, après retrait de compression, les quantifications de la minéralisation au niveau de la zone de calcification provisionnelle ont résulté en une augmentation de minéralisation pour le groupe dynamique de 4 semaines. En termes de modulation de croissance, les compressions statique et dynamique sont équivalentes. Seule une minéralisation augmentée a été observée après retrait de compression dynamique, ce qui supposerait que les mécanismes moléculaires déclenchés par le type de compression sont différents et affectent le processus de croissance osseuse longitudinale. Il s'avèrerait donc intéressant d'en comprendre l'origine et les mécanismes, ainsi que de vérifier si une minéralisation plus élevée est corrélée avec une meilleure qualité osseuse.

Pour l'objectif spécifique 3, les compressions statique et dynamique ont entraîné une réduction de la hauteur du disque intervertébral ainsi qu'une augmentation des contenus en protéoglycanes du noyau du disque intervertébral. Après retrait de compression, les hauteurs des disques des deux types de compression sont demeurées inférieures aux rats shams. Par contre, le contenu en protéoglycanes du noyau a diminué significativement suite au retrait de compression statique par rapport au dynamique, demeuré semblable aux rats contrôles. La compression statique montre des signes précoces de dégénérescence discale alors que la compression dynamique semble davantage préserver l'intégrité du disque.

Ces travaux sont les premiers à avoir investigué 1) différentes combinaisons de compressions dynamiques *in vivo* sur la croissance osseuse, et 2) l'application suivie du retrait subséquent de deux types de compression (statique et dynamique) avec une contrainte moyenne identique, à la fois sur la croissance, la minéralisation et la santé du disque intervertébral. À modulation de croissance identique, la compression statique a eu un effet nuisible à moyen terme sur la

composition du disque intervertébral, ce qui n'a pas été le cas de la compression dynamique. De plus, la minéralisation semble davantage stimulée suite au retrait de compression dynamique *versus* statique, ce qui pourrait être attribué à des échanges de fluide et un métabolisme cellulaire augmentés de façon bénéfique. Au vu des résultats obtenus, la compression dynamique, se rapprochant des chargements physiologiques par définition, permet la modulation de croissance souhaitée tout en préservant davantage le disque intervertébral. Par conséquent, il s'agirait d'un candidat de choix pour des applications cliniques telles que le développement de futurs implants sans fusion pour le traitement des scolioses précoces et idiopathiques adolescentes modérées.

Recommandations

Afin de poursuivre la recherche dans la même veine, de nouvelles pistes s'avèreraient intéressantes à investiguer à savoir :

- ✓ La prolifération et la durée des cycles cellulaires suite à l'application et au retrait de chargements dynamiques;
- ✓ Différents niveaux de contrainte de compression dynamique;
- ✓ La composition de la matrice extracellulaire suite à l'application et au retrait de chargement dynamique, en particulier les protéoglycanes et le collagène de types II et X;
- ✓ L'augmentation de la durée de retrait de chargement pour caractériser un effet à plus long terme et/ou la modification du protocole pour que le chargement et le retrait de chargement aient des durées égales;
- ✓ Les mécanismes biomoléculaires de l'ensemble du processus de minéralisation jusqu'à la caractérisation de l'os nouvellement formé;
- ✓ L'évaluation de la qualité de l'os formé suite à l'application et au retrait de chargements dynamiques avec plusieurs fréquences et amplitudes, en demeurant dans des plages de valeurs préservant l'intégrité des tissus mous (plaque de croissance, disque intervertébral);
- ✓ L'investigation des mécanismes conduisant à la perte de protéoglycanes du noyau du disque intervertébral en utilisant d'autres méthodes (essai avec le bleu de diméthylméthylène).

Ces points à élucider permettraient d'améliorer les fondements de base sur lesquels sont développées les nouvelles approches de traitements sans fusion dans l'optique de soigner les

patients présentant des déformations musculosquelettiques progressives, sans compromettre leur capital santé à long terme.

BIBLIOGRAPHIE

Akbarnia, B. A., James. N. Campbell, and Richard E. McCarthy

2012 Optimizing Safety and Outcomes in Spinal Deformity Surgery: Early Onset Scoliosis. *Spine Deform.*:53-63.

Akyuz, E., et al.

2006 Static versus dynamic loading in the mechanical modulation of vertebral growth. *Spine* 31(25):E952-8.

Alberty, A., J. Peltonen, and V. Ritsila

1993 Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 64(4):449-55.

Alvarez, J., et al.

2000 Different bone growth rates are associated with changes in the expression pattern of types II and X collagens and collagenase 3 in proximal growth plates of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 15(1):82-94.

Amini, S., D. Veilleux, and I. Villemure

2010a Three-dimensional in situ zonal morphology of viable growth plate chondrocytes: a confocal microscopy study. *J Orthop Res*.

—

2010b Tissue and cellular morphological changes in growth plate explants under compression. *J Biomech* 43(13):2582-8.

Anderson, H. C.

2003 Matrix Vesicles and Calcification. *Crystal Arthritis*:222-226.

Anderson, H. C., and I. M. Shapiro

2010 The Epiphyseal Growth Plate. *In* Bone and Development. F. Bronner, M.C. Farach-Carson, and H.I. Roach, eds. Pp. 39-64.

Anderson, H. C., et al.

2004 Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase-Deficient Mice. *American Journal of Pathology* 164(3):841-847.

Aronsson, D. D., and I. A. Stokes

2011 Nonfusion treatment of adolescent idiopathic scoliosis by growth modulation and remodeling. *J Pediatr Orthop B*.

Aronsson, D. D., et al.

1999 Mechanical modulation of calf tail vertebral growth: implications for scoliosis progression. *J Spinal Disord* 12(2):141-6.

Ballock, R.T., and R.J. O'Keefe

2003a The Biology of the Growth Plate. *Journal of Bone and Joint Surgery* 85:715-726.

Ballock, RT, and RJ O'Keefe

2003b Physiology and Pathophysiology of the Growth Plate. *Birth Defects Research* 69:123-143.

Basbaum, A. I.

2004 Molecular approaches to understanding to anatomical substrates of nociceptive processing. *In* The pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians, Progress in pain research and management. L. Villaneuva, A.H. Dickenson, and H. Ollat, eds. Seattle: IASP Press.

Betz, R. R., et al.

2005 Vertebral body stapling procedure for the treatment of scoliosis in the growing child. *Clin Orthop Relat Res* (434):55-60.

Betz, R. R., et al.

2010 Vertebral body stapling: a fusionless treatment option for a growing child with moderate idiopathic scoliosis. *Spine* 35(2):169-76.

Boersma, B., and J. M. Wit

1997 Catch-up Growth. *Endocr Rev* 18(5):646-661.

Breur, G. J., et al.

1997 The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates. *Calcif Tissue Int* 61(5):418-25.

Breur, G. J., et al.

1994 Stereological and serial section analysis of chondrocytic enlargement in the proximal tibial growth plate of the rat. *Anat Rec* 239(3):255-68.

Breur, G. J., et al.

1991 Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res* 9(3):348-59.

Bries, A. D., et al.

2012 A Study in Vivo of the Effects of a Static Compressive Load on the Proximal Tibial Physis in Rabbits. *the Journal of bone and joint surgery. American volume* 94-A.

Buckwalter, J. A., et al.

1986 Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am* 68(2):243-55.

Burwell, R. G., et al.

2009 Pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis in girls - a double neuro-osseous theory involving disharmony between two nervous systems, somatic and autonomic expressed in the spine and trunk: possible dependency on sympathetic nervous system and hormones with implications for medical therapy. *Scoliosis* 4(24).

Campbell, James. N., and Richard. A. Meyers

2006 Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*. 52(1):77-92.

Cancel, M., et al.

2008 Effects of in vivo static compressive loading on aggrecan and type II and X collagens in the rat growth plate extracellular matrix. *Bone* 44(2):306-15.

Castelein, RM, van Dieen, JH, Smit, TH

2005 The role of dorsal shear forces in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis - a hypothesis. *Medical Hypothesis* 65(501-508).

Chan, W. C. W., et al.

2011 Structure and Biology of the Intervertebral Disk in Health and Disease. *Orthop Clin North Am* 42:447-464.

Ching, C. , et al.

2004 Changes in nuclear composition following cyclic compression of the intervertebral disc in an in vivo rat-tail model. *Med Eng Phys* 26:587-594.

Ching, Congo T.S., et al.

2003 The effect of cyclic compression on the mechanical properties of the intervertebral disc: An in vivo study in a rat tail model. *Clinical Biomechanics* 18:182-189.

Chrysis, D., et al.

2002 Apoptosis Is Developmentally Regulated in Rat Growth Plate. *Endocrine* 18(3):271-278.

Cohen, B., W. M. Lai, and V. C. Mow

1998 A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis. *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* 120(4):491-496.

Colnot, C., and T. Alliston

2010 Tissue Interactions in Long Bone Development. *In Bone and Development*. F. Bronner, M.C. Farach-Carson, and H.I. Roach, eds. Pp. 25-38.

Cuisinier, F. J. G.

1996 Bone mineralization. *Biomaterials*:436-439.

Ducher, G., and C. J. Blimkie

2006 Adaptations architecturales du tissu osseux en réponse à l'exercice physique : intérêts et limites des méthodes non invasives utilisées chez l'homme. *Science & Sports* 21(5):255-267.

Emons, J. A., et al.

2005 Catch-up growth: testing the hypothesis of delayed growth plate senescence in humans. *the Journal of Pediatrics*:843-846.

Farnum, C. E., et al.

2002 Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: the contribution of organic osmolytes. *Bone* 30(4):574-81.

Farnum, C. E., et al.

2000 Quantitative three-dimensional analysis of chondrocytic kinetic responses to short-term stapling of the rat proximal tibial growth plate. *Cells Tissues Organs* 167(4):247-58.

Farnum, C. E., and N.J. Wilsman

1993 Determination of Proliferative Characteristics of Growth Plate Chondrocytes by Labeling with Bromodeoxyuridine. *Calified Tissue International* 52:110-119.

Ferland, C. E., F. Beaudry, and P. Vachon

2012 Antinociceptive Effects of Eugenol Evaluated in a Monoiodoacetate-induced Osteoarthritis Rat Model. *Phytother. Res.* 26:1278-1285.

Ferland, C. E., et al.

2011a Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 97:603-610.

Ferland, C. E., et al.

2011b Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45:423-429.

Fletcher, N. D., and R. W. Bruce

2012 Early onset scoliosis: current concepts and controversies *Pediatrics* 5:102-110.

Gafni, R. I.

2001 Catch-Up Growth Is Associated with Delayed Senescence of the Growth Plate in Rabbits. *Pediatr Res* 50(5):618-623.

Gil-Dones, F., et al.

2009 An Optimal Protocol to Analyze the Rat Spinal Cord Proteome. *Biomarker Insights* 4:135-164.

Golub, E. E.

2009 Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochimica et biophysica acta* 1790:1592-1598.

Gorman, T. M., et al.

2009 Mechanical axis following staple epiphysiodesis for limb-length inequality. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 91(10):2430-9.

Greene, W. B.

1993 Infantile tibia vara. *Instructional course lectures* 42:525-38.

Griffiths, G.

1993 Quantitative Aspects of Immunocytochemistry. *In Fine Structure Immunocytochemistry*. Pp. 371-445.

Hirata, H., et al.

2013 A Rat Tail Temporary Static Compression Model Reproduces Different Stages of Intervertebral Disc Degeneration with Decreased Notochordal Cell Phenotype. *Journal of Orthopaedic Research*:455-463.

Hunt, K. J., J. T. Braun, and B. A. Christensen

2010 The Effect of Two Clinically Relevant Fusionless Scoliosis Implant Strategies on the Health of the Intervertebral Disc. *Spine* 35(4):371-377.

Hunziker, E. B.

1994 Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microscopy research and technique* 28(6):505-19.

Hunziker, E. B., and R. K. Schenk

1989a Physiological Mechanisms adopted by Chondrocytes in regulating Longitudinal bone growth in rats. *Journal of Physiology* 414:55-71.

—

1989b Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol* 414:55-71.

Hunziker, E. B., R. K. Schenk, and L. M. Cruz-Orive

1987 Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 69(2):162-73.

Hutton, William C., et al.

2000 Does Long-Term Compressive Loading on the Intervertebral Disc Cause Degeneration? *spine* 25(23):2993-3004.

Hutton, William C., et al.

1998 The Effect of Compressive Force Applied to the Intervertebral Disc in Vivo. *Spine* 23(23):2524-2537.

Iatridis, J. C., et al.

1999 Compression-Induced Changes in Intervertebral Disc Properties in a Rat Tail Model. *Spine* 24:996-1002.

Iatridis, James C., et al.

2006 Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism in vivo. *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 2:41-46.

Jafari, L., et al.

2015 Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. *Physiol. Rep.* 3(1).

Kirsch, T., W. Wang, and D. Pfander

2003 Functional Differences Between Growth Plate Apoptotic Bodies and Matrix Vesicles. *J Bone Miner Res* 18(10):1872-1881.

Klein-Nulend, J., et al.

2013 Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone* 54:182-190.

Kouwenhoven, J-W. M., and R. M. Castelein

2008 The Pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine* 33(26):2898-2908.

Kronenberg, Henry M.

2003 Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423:332-336.

Lai, Alon, et al.

2008 Effects of Static Compression With Different Loading Magnitudes and Durations on the Intervertebral Disc: An In Vivo Rat-Tail Study. *Spine* 33(25):2721-2727.

Leboeuf, D., et al.

2008 Do estrogens impact adolescent idiopathic scoliosis? *Trends Endocrinol Metab* 20(4):147-152.

LeVeau, Barney F., and Donna B. Bernhardt

1984 Developmental biomechanics. Effect of forces on the growth, development, and maintenance of the human body. *Phys Ther* 64(12):1874-82.

Li, Y., et al.

2011 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity regulates the proliferative potential of growth plate chondrocytes. *Development* 138:359-370.

Lotz, Jeffrey C., et al.

1998 Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study. *Spine* 23(23):2493-2506.

Lowe, T. G., et al.

2000 Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 82-A(8):1157-1168.

Lui, J. C., O. Nilsson, and J. Baron

2011 Growth plate senescence and catch-up growth. *Endocr Dev* 21:23-29.

Mackie, E.J., et al.

2008 Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *the International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40:46-62.

Mackie, E.J., L. Tatarczuch, and M. Mirams

2011 The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol* 211:109-121.

MacLean, J. J., et al.

2003 Effects of immobilization and dynamic compression on intervertebral disc cell gene expression in vivo. *Spine* 28(10):973-81.

MacLean, Jeffrey J., et al.

2005 The effects of short-term load duration on anabolic and catabolic gene expression in the rat tail intervertebral disc. *J Orthop Res* 23(5):1120-7.

Marieb, Elaine N., and R. Lachaine

2005 *Anatomie et physiologie humaine.*

Marino, R., et al.

2008 Catch-up growth after hypothyroidism is caused by delayed growth plate senescence. *Endocrinology* 194(4):1820-1828.

Mayhew, T. M., and H. J. G. Gundersen

1996 'If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 188:1-15.

Ménard, A-L., et al.

2014 In Vivo Dynamic Loading Reduces Bone Growth Without Histomorphometric Changes of the Growth Plate. *Journal of Orthopaedic Research.*

Mente, P. L., et al.

1999 Mechanical Modulation of Growth for the Correction of Vertebral Wedge Deformities. *Journal of Orthopaedic Research* 17:518-524.

Morissy, R.T. , and D.W. Haynes

1989 Acute hematogenous osteomyelitis: a model with trauma as an etiology. *JPO* 9:447-56.

Mwale, Fackson, et al.

2002 The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *Journal of bone and mineral research* 17(2):275-283.

Newton, P. O., et al.

2008 Spinal Growth Modulation with Use of a Tether in an Immature Porcine Model. *J Bone Joint Surg Am.* 90:2695-2706.

Niehoff, A., et al.

2004 Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise. *Bone* 35(4):899-908.

Nilsson, O., and J. Baron

2004 Fundamental limits on longitudinal bone growth: growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Trends Endocrinol Metab* 15(8):370-4.

Noonan, K. J., et al.

1996 Spatial Distribution of CD44 and Hyaluronan in the Proximal Tibia of the Growing Rat. *J Orthop Res* 14:573-581.

Nordin, M.; Frankel, VH

2001 *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*: Lippincott Williams and Wilkins.

O'Keefe, R. J., et al.

1997 Differential regulation of type-II and type-X collagen synthesis by parathyroid hormone-related protein in chick growth-plate chondrocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 15(2):162-74.

Ohashi, N., et al.

2002 The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res* 17(2):284-92.

Ola Nilsson, Rose Marino, Francesco De Luca, Moshe Phillip, Jeffrey Baron

2005 Endocrine Regulation of the Growth Plate. *hormone Research* 64:157-165.

Pavasant, P., T. M. Shirazi, and Charles B. Underhill

1994 Distribution of hyaluronan in the epiphyseal growth plate: turnover by CD44-expressing osteoprogenitor cells. *Journal of Cell Science* 107:2669-2677.

—

1996a Hyaluronan contributes to the enlargement of hypertrophic lacunae in the growth plate. *Journal of Cell Science* 109:327-334.

—

1996b Hyaluronan Synthesis by Epiphysial Chondrocytes Is Regulated by Growth Hormone, Insulin-like Growth Factor-1, Parathyroid Hormone and Transforming Growth Factor-Beta1. *Matrix Biology* 15:423-432.

Pham, V.-M., et al.

2007 Évaluation du résultat du corset de Chêneau dans la scoliose idiopathique de l'adolescent. *Annales de réadaptation et de médecine physique* 50:125-133.

Quinn, R.

2005 Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? . *Nutrition*:775-777.

Reich, A., et al.

2005 Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization. *J Appl Physiol* 98(6):2381-9.

Reich, A., et al.

2008 The effect of weight loading and subsequent release from loading on the postnatal skeleton. *Bone* 43(4):766-74.

Robling, A. G., et al.

2001 Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone* 29(2):105-13.

Roughley, P. J., Y. Geng, and J. S. Mort

2014 The non-aggregated aggrecan in the human intervertebral disc can arise by a non-proteolytic mechanism. *European Cells and Materials* 28:129-136.

Rowe, D. E., et al.

1997 A Meta-Analysis of the Efficacy of Non-Operative Treatments for Idiopathic Scoliosis. *J Bone Joint Surg* 79(5):664-674.

Salenius, P., and E. Vankka

1975 The development of the tibiofemoral angle in children. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 57(2):259-61.

Salter, D. M.

1998 (II) Cartilage. *Current Orthopaedics* 12:251-257.

Samdani, A. F., et al.

2014 Anterior Vertebral Body Tethering for Idiopathic Scoliosis. *Spine* 39(20):1688-1693.

Schiller, J. R., N. A. Thakur, and C. P. Eberson

2010 Brace Management in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 468(3):670-678.

Schmid, E. C., et al.

2008 A novel fusionless vertebral physcal device inducing spinal growth modulation for the correction of spinal deformities. *Eur Spine J*.

Sengupta, P.

2013 The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*:624-630.

Sergerie, K., et al.

2009 Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. *Journal of biomechanics* 42(4):510-6.

Sivan, S. S., E. Wachtel, and P. J. Roughley

2014 Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochimica et biophysica acta* 1840:3181-3189.

Skaggs, D. L., et al.

2013 A Classification of Growth Friendly Spine Implants. *J Pediatr Orthop*

Staines, K. A., et al.

2012 MEPE is a novel regulator of growth plate cartilage mineralization. *Bone* 51:418-430.

Stokes, I. A.

2002 Mechanical effects on skeletal growth. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2(3):277-80.

Stokes, I. A., et al.

2006 Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. *Journal of orthopaedic research* 24(6):1327-34.

Stokes, I. A., et al.

1998 Mechanical Modulation of Intervertebral Disc Thickness in Growing Rat Tails. *Journal of Spinal Disorders* 11(3):261-265.

Stokes, I. A., et al.

2007 Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction. *Bone* 41(2):197-205.

Stokes, I. A., et al.

2005a Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading. *J Orthop Res* 23(1):188-95.

Stokes, I. A., and J. C. Iatridis

2004 Mechanical Conditions That Accelerate Intervertebral Disc Degeneration: Overload Versus Immobilization. *Spine* 29(23):2724-2732.

Stokes, I. A., et al.

2013 Metabolic Effects of Angulation, Compression, and Reduced Mobility on Annulus Fibrosis in a Model of Altered Mechanical Environment in Scoliosis. *Spine Deform.*:161-170.

Stokes, I. A., et al.

2002 Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 84A(10):1842-1848.

Stokes, I.A.F., et al.

2005b Modulation of vertebral and tibial growth by compression loading: diurnal versus full-time loading. *Journal of Orthopaedic Research* 23:188-195.

Tsai, A., et al.

2013 Discordant radiologic and histological dimensions of the zone of provisional calcification in fetal piglets. *Pediatr Radiol* 43:1606-1614.

Turner, C. H.

1998 Three Rules for Bone Adaptation to Mechanical Stimuli. *Bone* 23(5):399-407.

Valteau, B., et al.

2011 In vivo dynamic bone growth modulation is less detrimental but as effective as static growth modulation. *Bone*.

Veis, A., and J. R. Dorvee

2013 Biomineralization Mechanisms: A New Paradigm for Crystal Nucleation in Organic Matrices. *Calcified tissue international* 93(4):307-315.

Villemure, I.

2000 Étude biomécanique du processus de croissance et de déformation du rachis scoliotique, Université de Montréal.

Villemure, I., and I. A. Stokes

2009a Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *Journal of Biomechanics* 42(12):1793-803.

Wall, E. J., et al.

2005 Endoscopic mechanical spinal hemiepiphysiodesis modifies spine growth. *Spine* 30(10):1148-53.

Walsh, A. J., and J. C. Lotz

2004 Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading. *Journal of biomechanics* 37(3):329-37.

Wang, W., and T. Kirsch

2002 Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *The Journal of cell biology* 157(6):1061-9.

Wang, W., J. Xu, and T. Kirsch

2005 Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Experimental cell research* 305:156-165.

Wang, Y., et al.

2004 Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate zones identifies differentiation markers and signal pathways. *Bone* 35(6):1273-93.

White, August A., and Manohar M. Panjabi

1990 *Clinical biomechanics of the spine*. Pp. 1-373. Philadelphia: J.B. Lippincott Company.

Wilsman, N. J., et al.

1996a Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 14(4):562-72.

Wilsman, N. J., et al.

1996b Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics. *Journal of orthopaedic research* 14(6):927-36.

Wongdee, K., N. Krishnamra, and N. Charoenphandhu

2012 Endochondral bone growth, bone calcium accretion and bone mineral density: how are they related? *J Physiol Sci* 62:299-307.

Wuertz, Karin, et al.

2009 In Vivo Remodeling of Intervertebral Discs in Response to Short- and Long-Term Dynamic Compression. *Journal of Orthopaedic Research*:1235-1242.

Zerath, E., et al.

1997 TGF-beta2 prevents the impaired chondrocyte proliferation induced by unloading in growth plates of young rats. *Life Sci* 61(24):2397-406.

ANNEXE A : COMPLÉMENTS MÉTHODOLOGIQUES

A.1 Récupération des tissus et coupes

La seconde série expérimentale a permis d'analyser simultanément les plaques de croissance et disques intervertébraux. Pour ce faire, il a fallu récupérer des blocs de deux ou trois vertèbres, lors de la dissection tel qu'indiqué sur la figure ci-dessous (Figure 0.1).

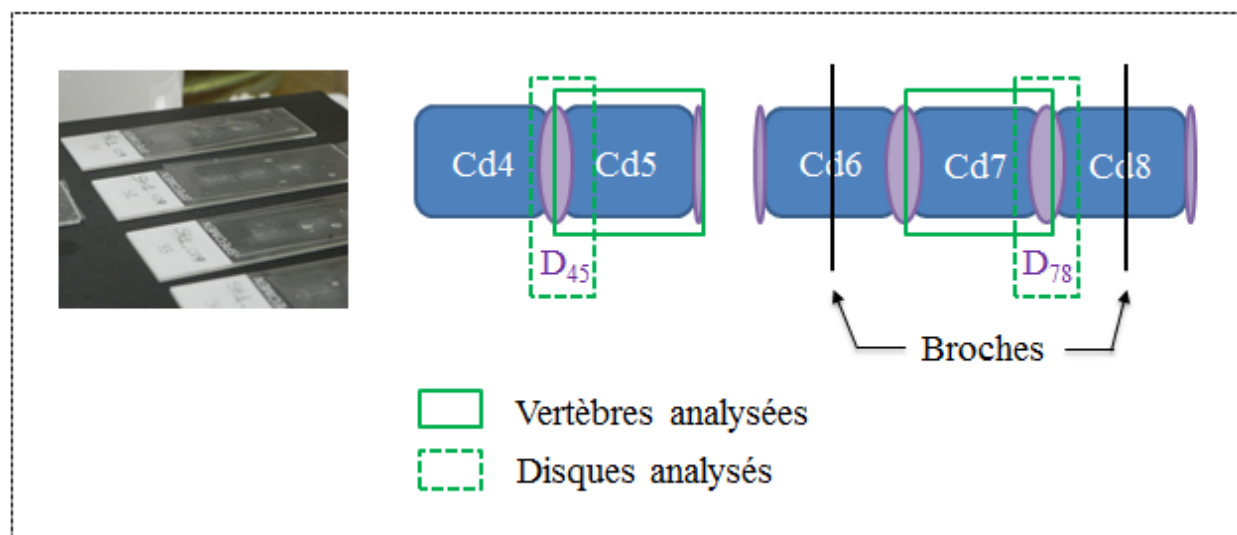


Figure 0.1: Sections de tissus montrant les vertèbres et disques analysés

A.2 Mesure de croissance *in vivo*

Le taux de croissance, par définition, est un indicateur quantitatif de la croissance longitudinale. Il est mesuré grâce à l'injection d'un fluorochrome. Ce dernier se fixe sur le front de minéralisation du nouvel os, observé par un marquage fluorescent (Alvarez, et al. 2000; Hunziker and Schenk 1989a). Plusieurs fluorochromes sont disponibles et peuvent être jumelés, comme dans l'étude de Stokes et coll. (Stokes, et al. 2007). Parmi les fluorochromes les plus courants, on compte l'oxytétracycline (Breur, et al. 1997; Breur, et al. 1991; Farnum, et al. 2000; Wilsman, et al. 1996a; Wilsman, et al. 1996b), l'orange de xylénol (Stokes, et al. 2007), la calcéine (Alvarez, et al. 2000; Cancel, et al. 2008; Hunziker and Schenk 1989a; Hunziker, et al. 1987; Valteau, et al. 2011).

Pour la mesure du taux de croissance, deux injections de marqueurs sont nécessaires, séparées de quelques jours. Le choix des jours d'injection et du marqueur est déterminé par la demi-vie du marqueur afin qu'il soit toujours présent dans le corps (non métabolisé) et le jour d'euthanasie de

l'animal. Le taux de croissance est alors calculé comme étant le ratio de la distance entre les deux fronts de calcification divisé par l'intervalle de temps séparant les deux injections (Cancel, et al. 2008). Dans ce projet de recherche, les injections ont été réalisées à trois jours d'intervalle, 2 et 5 jours avant euthanasie des animaux (Figure 0.2).

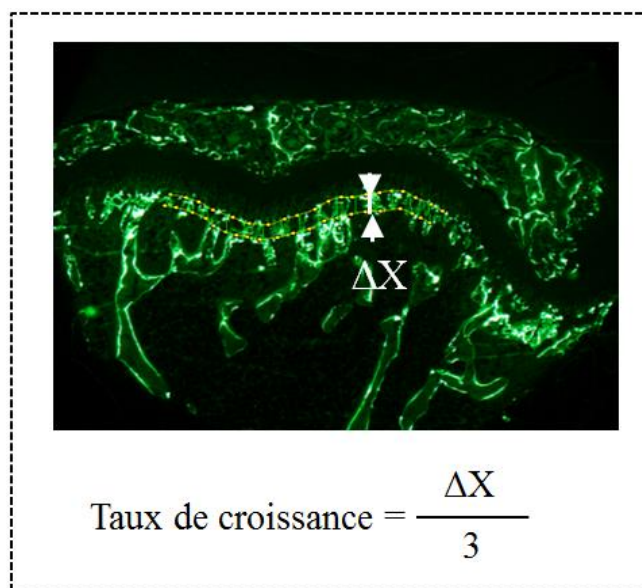


Figure 0.2: Mesures de taux de croissance sur une lame observée en microscopie à fluorescence (grossissement X5)

A.3 Mesure de hauteur du disque intervertébral

La hauteur du disque intervertébral a été mesurée à partir des échantillons *ex-vivo* imagés au microCT. Le disque n'apparaît pas sur les images mais on sait qu'il remplit l'espace vide entre deux vertèbres consécutives. Afin de reconnaître les vertèbres, une broche était insérée post-mortem dans une des vertèbres non analysées. La première étape était de réaliser la reconstruction des portions d'intérêt des vertèbres adjacentes à partir de valeurs de paramètres standards. Ensuite, la seconde étape consiste à sélectionner six sections par disque régulièrement espacées en s'assurant que les deux vertèbres adjacentes étaient visibles sur la première et la dernière image. Enfin, chaque image a été analysée séparément avec le programme Matlab en adaptant le grossissement avec le paramètre de conversion de pixels fourni par le scan pour obtenir la dimension réelle de la hauteur. Pour chaque disque, la hauteur finale était la moyenne des six images. Le programme Matlab semi-automatique est basé sur le même principe que les mesures de croissance de Valteau et coll. (Valteau, et al. 2011) et que les mesures de croissance

et histomorphométrique réalisées dans ce projet. Une verticale de mesure est prédéfinie par l'utilisateur afin de s'affranchir d'une possible rotation de l'image. Ensuite, les deux fronts sont obtenus par interpolation de splines à partir de points placés par l'utilisateur (Figure 0.3). La valeur numérique finale est donc la distance entre les deux fronts selon la verticale définie initialement.

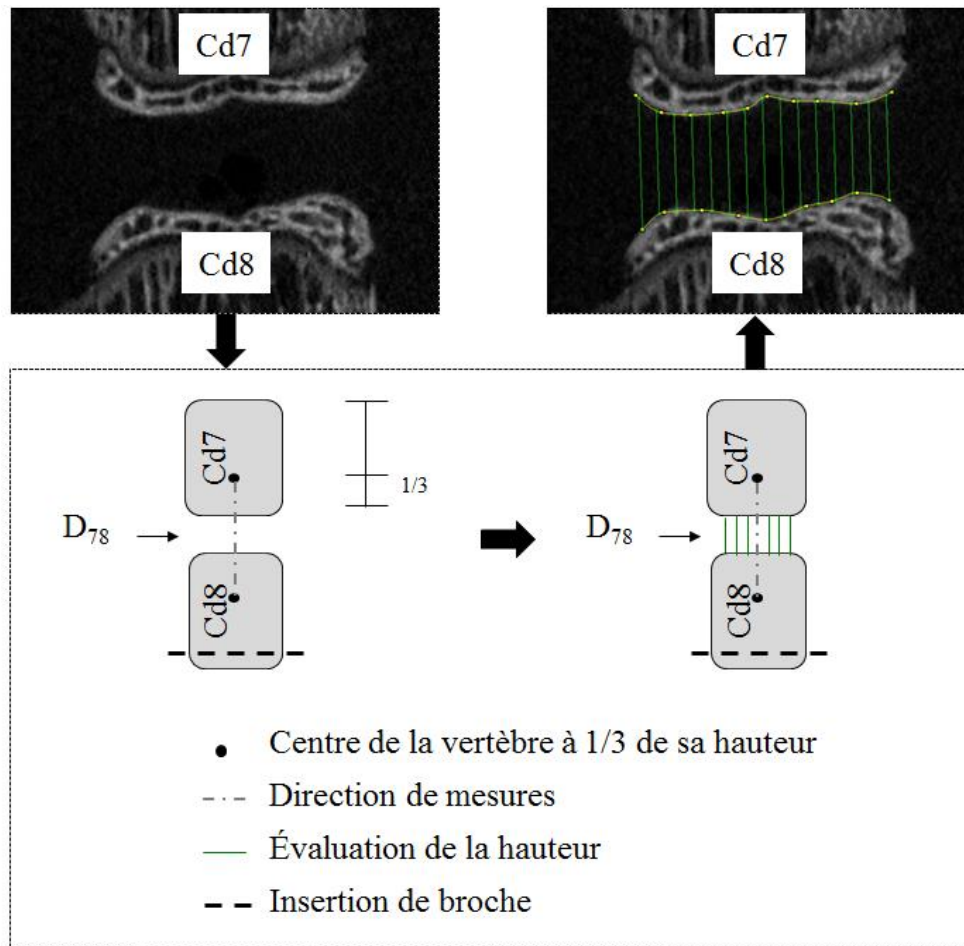


Figure 0.3: Mesures des hauteurs de disque avec le programme Matlab

A.4 Mesure de la proportion noyau/anneau par comptage de points (stéréologie)

Les méthodes stéréologiques sont des outils quantitatifs précis de paramètres géométriques et constitutionnels de structures en trois dimensions à partir de sections en deux dimensions (Griffiths 1993; Mayhew and Gundersen 1996). La stéréologie fait appel à des outils géométriques (points, lignes, plans) et son principe repose sur le comptage d'intersections entre ces outils géométriques et les objets ou structures d'étude (Griffiths 1993; Mayhew and Gundersen 1996).

Plus spécifiquement dans ce projet, la proportion volumique du noyau par rapport à l'anneau a été mesurée par la technique stéréologique de comptage de points (Breur, et al. 1994; Hunziker and Schenk 1989a; Hunziker, et al. 1987). Cette technique consiste à déposer une grille orientée aléatoirement et de dimensions déterminées en fonction de la taille des structures (noyau et anneau du disque) sur toutes les coupes à analyser (Figure 0.4). L'orientation aléatoire de la grille revêt une importance primordiale car elle permet de s'affranchir de l'orientation et de la forme de l'objet étudié (le disque intervertébral ici) (Figure 0.4). Ensuite, il s'agit de compter le nombre de points d'intersection entre la grille et la structure d'intérêt (noyau et anneau dans notre cas). La proportion volumique noyau/anneau est alors obtenue par le ratio du nombre total de points de toutes les coupes analysées du noyau divisé par celui de l'anneau (Griffiths 1993). Pour que le résultat final soit statistiquement significatif, il faut compter environ 200 points pour chaque structure (noyau et anneau séparément) et il est préférable d'obtenir ce total sur un plus grand nombre de coupes (Griffiths 1993).

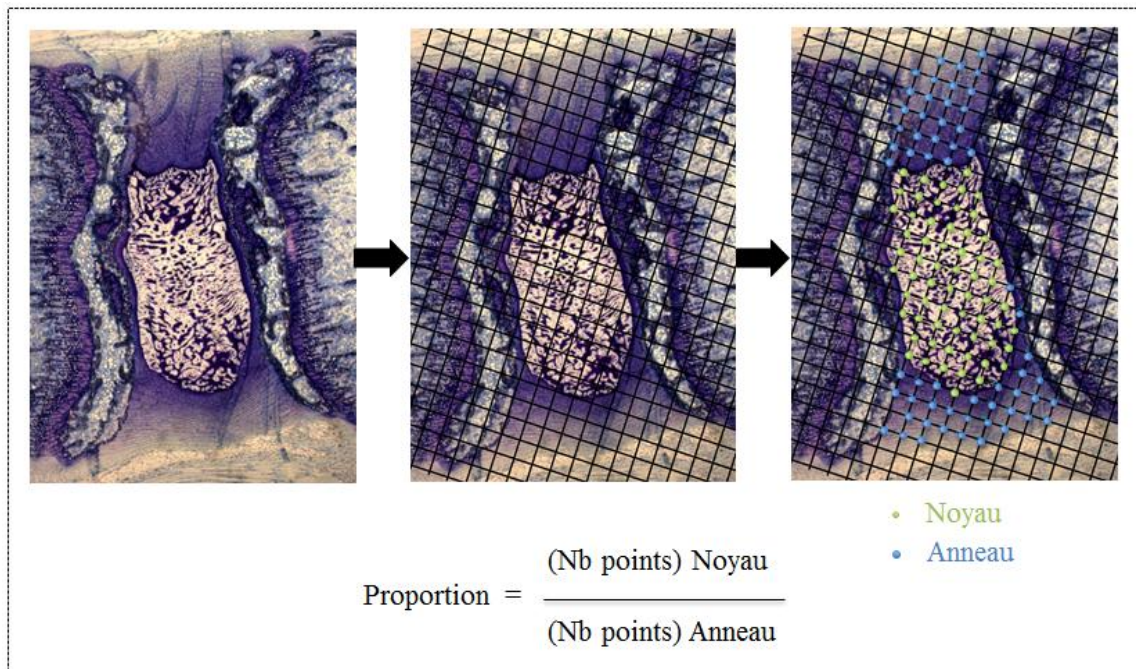


Figure 0.4: Méthode stéréologique de comptage de points appliquée à une lame de disque intervertébral, colorée à la toluidine bleue et imagée en microscopie optique (X2.5).

A.5 Étude de sensibilité et répétabilité des mesures

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude a fait l'effet de plusieurs validations et tests tels que résumés dans le tableau suivant :

Tableau 0.1: Mesures et validation pour chaque paramètre expérimental évalué dans les différents chapitres.

Chapitre	Paramètre évalué	Test/validation de la méthode	Mesure
Chapitre 3 - Première série expérimentale	Taux de croissance (GR)	Tests avec échantillons de Valteau et coll. (Valteau, et al. 2011)	✓ 12 mesures par vertèbre. Soit 6 séries de lames multipliées par 2 PC (distale et proximale)
	Hauteur de la plaque de croissance et des zones	Tests avec échantillons de Valteau et coll. (Valteau, et al. 2011)	✓ 12 mesures par vertèbre. Soit 6 séries de lames multipliées par 2 PC (distale et proximale)
	Hauteur des chondrocytes hypertrophiques	Tests avec échantillons de Valteau et coll. (Valteau, et al. 2011)	✓ 240 mesures par vertèbre. Soit 20 plus grosses cellules par coupe, multiplié par 12 (6 lames x 2 plaques de croissance distale et proximale)
	Densité cellulaire de la zone proliférative	Tests avec échantillons de Valteau et coll. (Valteau, et al. 2011)	✓ 60 mesures par vertèbre. Soit 5 colonnes par lame multipliées par 12 (6 lames x 2 plaques de croissance distale et proximale)

Chapitre	Paramètre évalué	Test/validation de la méthode	Mesure
Chapitre 4 - Seconde série expérimentale	Taux de croissance	Validation avec plusieurs mesures par échantillon/vertèbre	✓ 6 mesures par vertèbre. Soit 3 séries de lames au milieu de la vertèbre, multipliées par 2 PC (distale et proximale)
	Hauteur de la plaque de croissance et des zones	Validation avec plusieurs mesures par échantillon/vertèbre	✓ 6 mesures par vertèbre. Soit 3 séries de lames au milieu de la vertèbre, multipliées par 2 PC (distale et proximale)
	Hauteur des chondrocytes hypertrophiques	Validation avec plusieurs mesures par échantillon/vertèbre	✓ 90 mesures par vertèbre. À savoir : 15 plus grosses cellules par coupes, multiplié par 6 (3 lames et 2 PC par lame)
	Intensité de calcification	Validation avec plusieurs mesures par échantillon/vertèbre	✓ 4 mesures par vertèbre. Duplicata de lames multiplié par 2 PC par lame (distale et proximale)
	Concentration en SP et CGRP	Mesures réalisées par Dr Vachon et Dr Beaudry	✓ Une seule mesure par groupe, correspondant à la moyenne des 6 moelles épinières (broyées ensemble) des animaux d'un même groupe

Chapitre	Paramètre évalué	Test/validation de la méthode	Mesure
Chapitre 5 – Seconde série expérimentale	Hauteur des disques	Tests sur deux utilisateurs différents pour une partie des mesures	✓ 6 mesures par disque. Sections de disque choisies à intervalle sur les vertèbres adjacentes reconstruites avec les repères d'apparition des 2 PC adjacentes
	Proportion volumique noyau/anneau	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tests sur deux utilisateurs différents pour une partie des mesures ✓ Méthode stéréologique : données fiables autour de 200 points comptés entre la grille et la structure d'intérêt (Griffiths 1993), soit la grille et le noyau d'une part, ainsi que la grille et l'anneau d'autre part 	✓ Comptage entre 50 et 200 points sur 3 à 6 lames selon la visualisation du noyau maximal. Un minimum de 180 points (200 points -10% d'erreur) a été compté pour le noyau et l'anneau pour 83% des résultats
	Contenu en protéoglycanes du noyau	Tests sur deux utilisateurs différents pour une partie des mesures	✓ 3 à 6 mesures par disque. Le critère était d'analyser les lames avec le noyau maximal et pour certains disques, le noyau était décroissant